

#### A001 PROBIOTICS AS MODULATORS OF THE ACTIVITY OF THE IMMUNE SYSTEM IN EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS IN RATS

I. Abdurasulova, E. Tarasova, A. Matsulevich, I. Kudrjartsev, Y. Zhitnukhin, E. Ermolenko, A. Suvorov, V. Klimenko  
Institute of Experimental Medicine of RAMS, St. Petersburg, Russia

**Introduction.** Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) is an animal model of multiple sclerosis (MS). Multiple Sclerosis (MS) is an enigmatic immune-mediated disease of the central nervous system that affects around 300,000 individuals in Russia. Immune modulating therapy can delay the progression of MS, but it has a number of side effects and is extremely expensive. Probiotics, including enterococci, are known to induce immunomodulatory activity with promising effects on inflammatory diseases. Previously we have shown, that the probiotic *Enterococcus faecium* can stimulate the expression of anti-inflammatory cytokine IL-10 in rats.

The aim of this work was to compare the ability of *E. faecium* to attenuate the severity of EAE in rats in comparison with the reference preparation – copaxone.

EAE was induced in female Wistar rats by inoculation of homological spinal cord homogenate (HSCH) with complete Freund's adjuvant. Probiotic strain of *E. faecium* was administrated intragastrically (8,0 lg CFU/rat/day) for 16 days beginning since the inoculation of HSCH (n=25). Copaxone (C.) was administrated subcutaneously (4 mg/kg/day) in the same period (n=30). The rats from 3<sup>d</sup> group received the complex treatment (*E. faecium* L3 ig 8,0 lg CFU/rat/day and Copaxone sc 4 mg/kg/day) (n=25). The rats of control groups received pyrogen-free saline or intragastrically (n=10) or subcutaneously (n=10) or in complex (n=10).

The severity of neurological disorders was estimated by clinical index (c.i.) from 0 (without disorders) to 6 (mortality). The cell populations in blood were analyzed using Flow Cytometry (FC) on the 0, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup> days after inoculation of HSCH.

The treatment with *E. faecium* L3 rats decreased the severity and duration of the disease. Rats treated with probiotic had lower weight loss during the development of EAE, but the clinical symptoms of EAE developed in rats with probiotic treatment earlier than in group receiving C. Protective effect waned when probiotic and C. were co-administered.

The FC analysis of the blood cells populations found that illness control rats have increased CD3+CD8+ T cells (15,8%) on 14<sup>th</sup> day after induction of EAE. C. and *E. faecium* L3 both decreased this population of cells (4,1% and 5,5%, respectively). Furthermore, rats treated with C. have increased CD3+CD4+ T cells, whereas rats which were treated by *E. faecium* had the increased level of CD3+CD8+ T cells and decreased level of CD45RB+ cells. The rats from complex group have similar values to control rats.

**Conclusion.** Administration of *E. faecium* reduced severity and duration of EAE similar to C. Our data demonstrate that the protective effect of probiotic and C. can be mediated by different regulatory T cells.

Probiotic strain that also stimulates the regulatory cells of CD4+ population will be more effective for co-administration with Copaxone.

#### A002 HOMEOSTATIC INTERACTIONS OF VAGINAL LACTOBACILLI AND CERVICOVAGINAL EPITHELIAL CELLS

V. Abramov<sup>1</sup>, I. Kosarev<sup>1</sup>, V. Khlebnikov<sup>1</sup>, R. Vasilenko<sup>1</sup>, V. Sakulin<sup>1</sup>, N. Suzina<sup>2</sup>, O. Motuzova<sup>3</sup>, O. Milaya<sup>3</sup>, N. Vasilenko<sup>1</sup>, T. Boyko<sup>4</sup>, V. Uversky<sup>5,7</sup>, M. Chikindas<sup>6</sup>, V. Melnikov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Immunological Engineering, Lyubuchany, Moscow Region, Russia

<sup>2</sup>G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences Pushchino, Russia

<sup>3</sup>Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health, Moscow, Russia

<sup>4</sup>Crimea State Medical University, Simferopol, Russia

<sup>5</sup>Institute for Biological Instrumentation, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia;

<sup>6</sup>School of Environmental and Biological Sciences, Rutgers State University, New Brunswick, NJ 08901, USA

<sup>7</sup>University of South Florida, USA

*Lactobacillus crispatus* 2029 isolated upon investigation of vaginal lactobacilli of healthy women of reproductive age was selected as a probiotic candidate. The aim of the present study was elucidation of the role of *L. crispatus* 2029 in the forming of colonization resistance of female reproductive tract to genitourinary pathogens using cervicovaginal epithelial model. *L. crispatus* 2029 has surface layers (S-layers), which completely surround cells as the outermost component of their envelope. S-layers are responsible for the adhesion of lactobacilli on the surface of cervicovaginal epithelial cells. Study of interactions between *L. crispatus* 2029 and a type IV collagen, a major molecular component of epithelial cell extracellular matrix showed that <sup>125</sup>I-labelled type IV collagen binds to lactobacilli with high affinity (Kd= (8,0± 0,7)× 10<sup>-10</sup>M). *L. crispatus* 2029 consistently colonized epithelial cells.

There were no toxicity, epithelial damage and apoptosis after 24 h of colonization. Electronic microscope images demonstrated intimately associated *L. crispatus* 2029 and epithelial cells. Upon binding to epithelial cells lactobacilli were recognized by toll-like 2/6 receptors (TLR2/6). *L. crispatus* induced NF-κB activation in epithelial cells and did not induce expression of innate immunity mediators IL-8, IL-1β, IL-1α and TNF-α. Unlike to *L. crispatus* 2029 TLR2/6 agonist MALP-2 induced NF-κB activation and production of proinflammatory cytokines IL-8, IL-1β, and TNF-α in epithelial cells. *L. crispatus* 2029 inhibited IL-8 production in epithelial cells induced by MALP-2 and increased production of anti-inflammatory cytokine IL-6, maintaining the homeostasis of female reproductive tract. *L. crispatus* 2029 produced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and provided wide spectrum of antagonistic activity increasing colonization resistance to urinary tract infections, bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis agents.

#### A003 ESTIMATION OF WORLDWIDE GUT MICROBIOTA ANTIBIOTIC RESISTANCE RESERVOIR

D. Alexeev, B. Kovarsky, P. Mazin, A. Tyakht

Research Institute of Physical-Chemical Medicine  
Institute for Information Transmission Problems RAS

Most of modern metagenomic studies are limited to functional and taxonomic content comparison,

while genome differences of individual-specific strains are left unattended. We have developed an approach for identification of different statistical measures of genetic variety of human gut microbiota. This approach was applied to 322 faecal metagenomes of individuals from USA, Denmark, China and Russia. For 93 most abundant microbial species we analyzed how various factors especially place of residence of individuals are related with genome differences. Despite of complication caused by distinction in coverage profiles we managed to compare mutation rates and strain diversity of dominant species. We reveal different patterns of groupings of samples depending on bacterial species. In case of some species samples are clustered according to geographic factor, but some species don't demonstrate any geographic-based stratification of samples. This fact allow us to speculate on ways of bacterial colonization of human intestine.

The method applied also allowed us to see the effect of antibiotic resistance spread in population and we used the technique to monitor the resistnace in groups of patients under heavy antibiotic treatment.

#### **A004 MOLECULAR GENETIC EXAMINATION OF NONTOXIGENIC STRAINS OF CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE ISOLATED FROM PATIENTS OF TERRITORIAL MENTAL HOSPITAL**

**I.N. Alexeeva, N.V. Kasyanenko, I.A. Chagina, G.F. Rakitsky**

*Territorial Mental Hospital, State Budget-Funded Institution of Public Health under Khabarovsk Krai Department of Public Health, Khabarovsk*

*NI Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology,*

*Federal Budget-Funded Institution of Science under the Federal Service for Supervision in the Field of Consumer Right Protection and Human Welfare*

Preventive medical survey of 29,732 patients was carried out as part of epidemiological monitoring of *Corynebacterium diphtheriae* carriage at the Territorial Mental Hospital in Khabarovsk during 2011-2013. Toxigenic strains of *C. diphtheriae* were not isolated. One hundred and fifteen nontoxigenic strains were isolated with 96 strains (83.5%) thereof identified as *C. diphtheriae mitis* biovariant, 18 strains (15.6%) – as *C. diphtheriae gravis* biovariant, and 1 strain (0.9%) – as *C. ulcerans*.

In furtherance of Letter No. 01/6830-12-32 *On Organization of Research into Cultures of Pertussis and Diphtheria Agents* of June 19, 2012 and Order No. 947 *On Improvement of Epidemiological Surveillance and Prevention of Diphtheria, Tetanus and Pertussis* of November 28, 2011 issued by the Federal Service for Supervision in the Field of Consumer Right Protection and Human Welfare, we sent the nontoxigenic strains isolated (101) to the Reference Center of NI Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology.

All cultures, including 83 nontoxigenic *C. mitis* biovars, 17 nontoxigenic *C. gravis* biovars and 1 nontoxigenic *C. ulcerans* were re-identified. There were no discrepancies of phenotypic properties with the results of the bacteriological laboratory. Upon molecular genetic examination of *C. diphtheriae*, no nontoxigenic tox-carrying strains were found. Upon molecular genetic examination of *C. ulcerans*, the given strain was found to be tox-carrying.

All strains isolated at the Territorial Mental Hospital in Khabarovsk were added to the collection of *C. diphtheriae*

strains stored at Gabrichevsky Research Institute in Moscow.

Monitoring of nontoxigenic and toxigenic *C. diphtheriae* strain carriage is aimed at preventing people from catching diphtheritic infection.

#### **A005 ELUCIDATING THE ROLE OF HUMAN GUT MICROBIOTA IN DISEASES: METAGENOMICS TO THE RESCUE**

**M. Arumugam**

*University of Copenhagen*

The trillions of microorganisms living in the human body, collectively known as the human microbiota, have a tremendous influence on human health and diseases. Although it was virtually impossible to study them until a few years ago, next generation sequencing technologies have enabled us to access and characterize these microbiota in a culture-free manner using metagenomic sequencing. Thanks to these developments, a new family of studies known as metagenome-wide association studies (MGWAS) have reported significant associations between the human microbiota and diseases, such as type 2 diabetes.

Recently, we have shown that human gut microbial richness strongly correlates with metabolic markers. This is only the beginning of a new trend to elucidate the role of host-associated microbiota in diseases, and bioinformatics is becoming increasingly important in this endeavor. In this talk, our published and ongoing research on understanding the role of the gut microbiota in obesity and diabetes will be discussed.

#### **A006 ENTEROCOCCUS FAECIUM STRAIN L-3 AS ANTIHELICOBACTER MEDICATIONS: EFFICACY IN VITRO**

**N.V. Baryshnikova<sup>1,4</sup>, Y.P. Uspenskiy<sup>1</sup>, A.V. Svarval<sup>2</sup>, R.S. Ferman<sup>2</sup>, A.B. Zhebrun<sup>2</sup>, A.N. Suvorov<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Saint-Petersburg State Medical University n.a. I.P. Pavlov, St. Petersburg, Russia*

<sup>2</sup>*Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russia*

<sup>3</sup>*Institute of Experimental Medicine, RAS, St. Petersburg, Russia*

<sup>4</sup>*Elizavetinskaya hospital, St. Petersburg, Russia*

**Background:** It is known that addition of different probiotics to the standard eradication therapy can increase eradication rate. According to Maastricht-IV (2012): «certain probiotics and prebiotics show promising results as an adjuvant treatment in reducing side effects». But also probiotics can have any other effects, eg. positive influence of probiotic on the human immune system or by the direct inhibition of *H. pylori* by bacteriocines of probiotic strain.

**The aim:** To analyze the efficacy of *Enterococcus faecium strain L-3* as antihelicobacter medications *in vitro*.

**Methods:** 14 strains of *Helicobacter pylori* were successfully cultivated from dyspeptic patients. Incubation was made in standard conditions for *H. pylori*. We used probiotic medication contain *Enterococcus faecium strain L-3*. The studied probiotic medications were dissolved in distilled water in part 1:100 and were added in a cup with an agar with different *H. pylori* strains. The assessment of growth of *H. pylori* was analyzed after 6–7 days. Statistical estimation was performed in Excel for Windows XP.

**Results:** Inhibition of grow of *H. pylori* was in 78.6% with *Enterococcus faecium strain L-3*.

**Conclusion:** these results can be associated with direct inhibition of *H. pylori* by probiotic strain *Enterococcus faecium strain L-3*. But it is necessary to do more researches to confirm this fact.

#### A007 CONTRIBUTIONS OF GNOTOBIOLOGY TO PROBIOTIC RESEARCH

A. Bomba<sup>1</sup>, R. Nemcová<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pavol Jozef Šafárik University in Košice, Faculty of Medicine, Institute of Experimental Medicine, Slovak Republic

<sup>2</sup>University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Department of Microbiology and Gnotobiology, Laboratory of Gnotobiology, Slovak Republic

Germ-free and gnotobiotic animals are extremely suitable experimental models for probiotic research. Gnotobiotic animals can be used in the selection process of probiotic microorganisms *in vivo*, in the study of the mode of probiotic action, the influence of probiotics on the host, the inhibitory effect of probiotics against pathogens of the digestive tract and the possibilities of enhancing the effect of probiotic microorganisms. Our experiments using gnotobiotic lambs and pigs have been aimed at the mode of action of probiotics and the study of the possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. The results of our experiments using gnotobiotic animals showed that the competition for adhesion receptors on the intestinal mucosa did not seem to play a decisive role in the mechanisms of inhibition of enterotoxigenic *E. coli* adhesion to the intestinal mucosa by lactobacilli. More likely it seemed to be a metabolite-mediated inhibition. The significantly higher levels of the lactobacilli produced organic acids in the intestinal mucosal film in comparison to the intestinal content may present an efficient barrier inhibiting the adhesion of digestive tract pathogens to the intestinal mucosa. It was showed that probiotic effect of microorganisms can be potentiated by combining them with bioactive substances of natural origin. Maltodextrin KMS X-70 stimulated the inhibitory effect of *Lactobacillus casei* on adhesion of *E. coli* to jejunal mucosa of gnotobiotic piglets. It was shown in our experiments that polyunsaturated fatty acids promote the adhesion of probiotic microorganisms to mucosal surfaces and their inhibitory effect against *E. coli* in the digestive tract of piglets.

In our future research, gnotobiotic animals will be used in the study of the role of gut microbiota in the pathogenesis of atherosclerosis and colorectal cancer and its possible modulation using probiotics and natural bioactive substances in the prevention of both diseases.

#### A008 DETECTION OF BOWEL MICROECOLOGICAL CHANGES BY CALCULATION OF LOCAL ANTIOXIDANT INDEX

V.M. Bondarenko, M.N. Gapon, L.N. Ternovskaya

Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don, Russia

**Aim.** The assessment of bowel dysbiotic state based on the definition of local antioxidant index (LAI). **Materials and Methods.** On the experimental model of intestinal dysbiosis in 105 mice induced in animals by intraperitoneal administration of gentamicin in the dynamics of fecal supernatants were examined in parallel conventional

bacteriological and biochemical methods. On the state of the microbiota judged on the basis of microbial indicator cards and LAI values, reflecting the ratio between the activity of superoxide dismutase and catalase to the number in the sample malondialdehyde. The activity of catalase, superoxide dismutase and malondialdehyde concentration was evaluated photometrically largest optical density.

**Results.** In coprofiltrates experimental animals in the dynamics of experimental intestinal microbiological changes controlled bacteriological method, observed monotonous declines in LAI in the blood and fecal supernatants. The LAI value below 20 detected in fecal supernatants of 155 patients with bacteriological confirmation microbiological changes was correlated with the presence of expressed microecological changes and allow to avoid invasive method for receiving biomaterials. **Conclusion.** A criterion for identifying habitat dysbiotic state based on the calculation of local antioxidant index in fecal samples.

#### A009 CHAP DOMAIN OF TAIL-ASSOCIATED PROTEIN FROM PHAGE 812 AND ITS LYTIC ACTIVITY AGAINST STAPHYLOCOCCUS AUREUS

M. Benesik<sup>1</sup>, R. Dopitova<sup>2</sup>, L. Janda<sup>1,2</sup>, J. Doskar<sup>1</sup>, M. Mosa<sup>3</sup>, J. Bostik<sup>3</sup>, R. Pantucek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>CEITEC, Brno, Czech Republic

<sup>3</sup>MB PHARMA s.r.o., Praha, Czech Republic

*Staphylococcus aureus* is a major causative agent of human and animal diseases. The increasing number of pathogenic strains resistant to antimicrobial drugs is a serious public health problem that can be solved by applications of phage therapy as a suitable alternative to antibiotics treatment. Currently the research focus on the phage encoded antimicrobial proteins applicable to combat bacterial infections, such as phage endolysins that digest the cell wall of bacteria.

In this study we focused on tail hydrolase of polyvalent staphylococcal bacteriophage 812, a member of SPO1-like viruses from family *Myoviridae*. This enzyme plays a role in the beginning of phage lytic cycle. It disturbs bacteria cell wall for injection of phage DNA into bacterial cell. CHAP domain was predicted at C-terminus of tail-associated protein by bioinformatics tools Total length of tail protein is 808 aa and CHAP domain is represented by 130 aa. The gene sequence for the CHAP domain was cloned and expressed as a soluble protein in *E. coli*. Expressed protein with his-tag was purified using metal-chelate affinity chromatography. Activity of this enzyme was verified on zymogram and using turbidity assay.

Results show, that CHAP domain of tail-associated protein can lyse peptidoglycan of *S. aureus* in zymograms. CHAP domain is also active against live bacterial cells and the protein decreases optical density of bacterial culture. Tail hydrolase is not as active like endolysin of phage 812. This problem can be resolved by modification of active site or by connecting CHAP domain with another domain.

This work was supported by projects of Technology Agency of the Czech Republic (TA01010405) and Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic (FR-TI4-417) and Student Project Grant at MU (MUNI/A/0910/2013).

### **A010 EXPERIENCE OF PRODUCTION OF GNOTOBIOTIC GUINEA PIGS (CAVIA PORCELLUS L.) IN ANIMAL BREEDING FACILITY OF BIBC RAS**

**A.S. Chernov, G.B. Telegin**

*Branch of Shemyakin and Ovchinnikov institute of bioorganic  
chemistry Russian academy of sciences, Pushchino, Russia*

Gnotobiotic animals represent unique model for medico-biological researches. Interest to these animal species is caused by that use gnotobionts, for example, sterile, allows to study various physiological and pathological processes in pure form without influence of an accompanying microbic factor, and use the gnotobiotic animals with certain associations allows to establish precisely influence of separate microorganisms on these processes. Gnotobionts present a certain interest and in the field of laboratory animal husbandry as are a basis of receiving animals, free from pathogenic factors (SPF – animals), the extremely necessary to experimenters.

For the first time on the basis of Animal breeding facility (ABF) BIBC RAS gnotobiotic guinea pigs was producing. And which contents in the gnotobiological conditions we used a surgical isolator and an isolator for the contents.

For receiving the gnotobiotic guinea pigs used operation of a gisterotomiya (Cesarean section) in an operational isolator of own design. Anesthetized pregnant female, with prepared by rules of surgery an operational field on skin of a belly wall, pasted by means of special glue to a film of the operational block outside (from below) an isolator. Then the surgeon, through long handling gloves of the camera of an isolator, cut in one stage from within an isolator a film of the operational block and skin of a stomach hermetically stuck together with it. Then prepared hypodermic cellulose, stomach muscles, a peritoneum. Further in an operational wound tightened alternately uterus horns, and cut a uterus, taking young animals in the sterilized internal environment of the camera of a gnotobiological isolator. Thus, excepting possibility of any contact young the gnotobiotic guinea pigs with an unsterile external environment.

In the subsequent, newborn guinea pigs from sterile conditions of a uterus of a healthy female at once transferred to the sterile camera of an isolator for the contents that provided their gnotobiological status. The first generation of sterile animals within 2 weeks after operation brought up on a synthetic sterile diet of L-477. As additional top dressing sterile regenerant of carrots that allowed to increase considerably the term of life of animals used and to improve their physiological state.

### **A011 PRODUCING OF GENETICALLY MODIFIED MICE OF SPF-CATEGORY FOR SCIENTIFIC RESEARCHES AND PRECLINICAL TESTS**

**A.S. Chernov, G.B. Telegin**

*Branch of Shemyakin and Ovchinnikov institute of bioorganic  
chemistry Russian academy of sciences, Pushchino, Russia*

The technology of production animals-biomodels is one of actively developing directions of biomedicine in the last decade. Despite it, in Russia there are no producers of the laboratory rodents offering to researchers of service in receiving quality new genetically modified animals-biomodels.

The purpose of this work was to master and introduce in production of Animal breeding facility (ABF) BIBC

RAS technology of receiving gene-modified mice with use of the embryonic stem cells (ESC) with the established microbiological status. We used the latest developments of experimental embryology, genetic engineering and microsurgical equipment.

The main objective of ABF BIBC RAS – production of high-quality laboratory rodents of SPF-category (free from the specified florula) for research works and biomedical tests. For expansion of services in granting to researchers in Russia new gene-modified animals-biomodels on the basis of ABF in 2007 the Center of collective using between BIBC RAS, Institute of molecular biology of W.A. Engelhardt RAS and the Bioinzheneriya Center of the RAS was created. As the main approach, for receiving transgenic mice the method of injection of transformed ESC in a cavity blastocyst was chosen. Now the given method on mice is recognized as the classical. This method creates unlimited opportunities for creation of various transgene mice, including and biomodels of diseases of the man.

During introduction and working off of this technology on the basis of ABF BIBC RAS, more than 15 lines of transformed ESC were used. The chimerical animals was succeeded to receive for operating time from 8 ESC lines. From which 2 stable lines of transgene mice were received subsequently.

The "Receiving gene-modified animals by a method of an injection of embryonic stem cells in a cavity blastocysts" technology is known around the world long ago, but for Russia it is the first experience when rigid standardization on selection of the conditions, used materials and control, allowed to scale this technology for production of animals-biomodels of SPF-category.

Now the ABF of BIBC RAS is the only production in Russia laboratory rodents of the SPF-category, accredited AAALAC International since 2004. The control system of ABF was estimated and certified as ISO 9001:2008 meeting the requirements for "Development of production (genetically modified animals), cultivation, the contents, delivery of small laboratory rodents for tests and researches".

### **A012 TREATMENT OF BACTERIAL INFECTIONS WITH BACTERIOPHAGES SOLUTION. FIRST CLINICAL RESULTS**

**N. Danelia, B. Wippermann, C. Krettek**

*Trauma Department Medical School Hannover, Germany*

**Introduction.** Bacterial infections are a common problem among hospitalized patients. The risk of having a pathogen bacterial infection that is not responsive to any agent is a threat. Infected as well as contaminated patients have to be isolated during their time of hospitalisation, making their treatment much more complicated.

This pilot study investigates the effectiveness of the polyphages solution MonoPhag® for the treatment of chronic musculoskeletal infections.

**Material and Methods.** First, we examined if MonoPhag® was reacting positively to bacterial strains at our local lab. 139 bacteria were isolated from patients and sent to a local microbiological lab for further examination. The plaque test of MonoPhag® for each colony was assessed in the microbiology department of MHH. These findings (88%) suggested the effectiveness of MonoPhag® on a wide spectrum of bacteria, especially on Metacillin Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA).

After permission by the institutional review board («Ethikkommission»), eight patients with nine chronic musculoskeletal infections were treated with MonoPhag® in a prospective study.

Inclusion criteria were:

1. Persisted bone or soft tissue infection (more than six months) after antibiotic and surgical treatment

2. Positive proof of bacterial contamination

Indications were five chronic osteitis and four chronic soft-tissue wounds with proven bacterial infections.

Treatment was the following:

After surgical debridement and removal of all necrotic tissue, MonoPhag® was applied by irrigation and drenched dressings. The application of MonoPhag® was repeated daily. Swabs were taken every third day. Finally, eradication of the bacterium was confirmed by three negative swabs.

**Results.** In seven of nine cases elimination of the agent has been confirmed. On average, the interval between the day of operation and the first of the three consecutive negative swabs was six days (range 5 to 21). In a case where the elimination of the multiresistant enterococcus faecalis could not be achieved, the patient had a chronic osteomyelitis after an open femur fracture with a callus formation. Because of the persisting MRSA infection, an amputation was performed.

We see the outstanding advantages of the Phagetherapie compared to conventional antibiotic therapy:

1. In a more potent effect including against resistant pathogens.

2. In the short duration of treatment.

3. The targeted effect against the bacterial cell and thus lack of side effects.

### **A013 THE INFLUENCE OF VAGINAL MICROBIOTA ON THE ACTIVITY OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS HIGH-RISK HPV IN WOMEN OF CHILDBEARING AGE**

**K. Ermolenko, V. Isakov, L. Kraeva, A. Zakrevskaya, D. Ermolenko**

*Institute of Epidemiology and Microbiology named after Pasteur, Saint Petersburg, Russia*

Epidemiological studies of the first decade of the XXI century have shown that worldwide 12% of women with no cervical pathology are infected with human papilloma virus (HPV). Prevalence of HPV increases in women with cervical pathology proportionally to severity. Intensity of these changes depends not only on the duration of persistence of pathogens, but also on the degree of their activity. It defines the need to identify the factors that affect this activity.

The objective of this study was to compare the viral load of HPV in women with anaerobic vaginosis and patients with normal vaginal microbiota.

40 women aged 23–32 with bacterial vaginosis, diagnosed by microscopy of urogenital tract, bacteriological research and specific clinical picture, were selected for this study. The control group consisted of 40 women aged 25–34 without menstrual disorders with normal vaginal microbiota confirmed using the same methods. The presence of any concomitant protozoal, bacterial or viral infections of the urogenital tract was considered as exclusion criteria. In all patients, both in study and control groups, using real time PCR HPV of phylogenetic groups A5, A6, A7 and A9, were diagnosed.

Low risk HPV (types 6 and 11) haven't been identified in any of the patients. Clinical manifestation of HPV

had 23 (57.5%) women from study group and 28 (70%) from control group. In 5 (12.5%) women from study group and 9 (22, 5%) from control group changes in the mucous membrane of the vaginal part of the cervix (planar formation) were detected only at colposcopy study. Evaluation viral load showed that the main group is contingent was significantly higher ( $p < 0,005$ ) than in patients of the control group ( $lg5,24 \pm 0,18$  and  $lg4,30 \pm 0,26$ , respectively).

The presence of anaerobic vaginosis in patients with concomitant HPV infection of the urogenital tract can support and stimulate the activity of HPV, which contributes to more frequent manifestations of this infection. This indicates the need to study the genital tract microbiota in all patients with diagnosed HPV-infection. Correction of vaginal microbiota can be considered as a mandatory part of therapeutic interventions in the treatment of urogenital tract HPV infection in women.

### **A014 INFLUENCE OF INDIGENOUS ENTEROCOCCUS ON THE INTESTINAL MICROBIOTA OF RATS WITH DYSBIOSIS**

**E. Ermolenko<sup>1,2</sup>, D. Svirido<sup>3</sup>, M. Kotyleva<sup>1,2</sup>, A. Karaseva<sup>1</sup>, V. Simanenkova<sup>3</sup>, A. Suvorov<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of experimental medicine, St. Petersburg, Russia*

<sup>2</sup>*St. Petersburg University, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia*

The use of probiotics for the correction of dysbiosis is not always effective. Probiotic bacteria might inhibit the growth of obligate members of microbiota or can be quickly eliminated due to manifestations of colonization resistance of the host. In these cases usage of autoprobiotics can be a better way for restoring of normal microbiota. However, little is known about the specific impact of the autoprobiotics on the disorders of intestinal microbiota.

The aim of the study was to reveal the effect of the indigenous *Enterococcus faecium* strains on the intestinal microbiota and the duration of their persistence in the gut.

Intestinal dysbiosis of male SPF Wistar rats was induced by administration of antibiotics (ampicillin® and metronidazole®). These rats were divided into experimental group (iE) and control group 1 (C1). Then for 5 days milk fermented products containing of indigenous *E. faecium* (iE.f.) were introduced intragastrically. These strains were isolated from feces of rats before consumption of antibiotics and examined for the presence of pathogenicity genes: (asa, esp, spr, cylA and cyl M). Then nonpathogenic iE.f. strains were transformed with the plasmid carrying the gene of erythromycin resistance employing electroporation. Ery+ clones were selected, grown individually and fed to the animals with dysbiosis. Rats from the group C1 did not receive probiotics after injection of antibiotics. Animal; from the control group 2 (C2) did not receive any antibiotics or probiotics. Study of the fecal samples of all animals, collected in first, third and 8<sup>th</sup> days of experiment (daily until 34 days of experiment in group iE), were performed by real time PCR and bacteriologically.

After administration of antibiotics for 3 days, the following changes in gut microbiota of rats were identified: 1) decrease in the quantity of *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.* and *Faecalibacterium prausnitzii*; 2) appearance of putative opportunistic bacteria such as *Proteus spp.* and *Klebsiella spp.*, *Clostridium difficile*. By the

end of the experiment, only the group iE showed recovery of the quantity of lactobacilli, bifidobacteria, *F. prausnitzii* and enterococci. At the same time, all opportunistic bacteria under study in this group (excluding *Klebsiella*) disappeared. iE.f. were detected in all the animals on the 16<sup>th</sup> day of experiments with a gradual decrease in the quantitative content in the fecal samples (6 to 1 lg CFU/g) and the complete disappearance of each animals at different times. On 32<sup>th</sup> day of the experiment iE.f. were not detected. Thus, indigenous *E. faecium* are capable to persist for a long time in the intestine providing a beneficial influence on gut microbiocenosis without suppressing beneficial members of the normal microbiota.

Work was supported by grant 13-04-01861.

#### **A015 INFLUENCE OF DIFFERENT PROBIOTICS ON IMMUNE SYSTEM AND STRUCTURE OF MUCOSA IN THE EXPERIMENTAL MODEL OF DYSBIOSIS**

**E. Ermolenko<sup>1,2</sup>, E. Tarasova<sup>1</sup>, G. Leontieva<sup>1</sup>, O. Rybalchenko<sup>2</sup>, Y. Borshchev<sup>1</sup>, T. Kramskaya<sup>1</sup>, O. Orlova<sup>2</sup>, A. Gorshkov<sup>2</sup>, V. Danilenko<sup>3</sup>, A. Suvorov<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of experimental medicine, St. Petersburg, Russia*

<sup>2</sup> *St. Petersburg University, St. Petersburg, Russia*

<sup>3</sup> *Institute of General Genetics, Moscow, Russia*

The aim of the study was to reveal the differences between the influence of various probiotic strains on the immune system and intestinal wall morphology of rats with antibiotic associated dysbiosis.

Intestinal dysbiosis of male Wistar rats was induced by administration of antibiotics (ampicillin® and metronidazole®). Then for 5 days probiotic strains: *Lactobacillus rhamnosus* K32 (L), *Bifidobacterium longum* GT15 (B), *Enterococcus faecium* L3 (E) were introduced intragastrically. Rats from the control groups 1 (C1) did not receive probiotics. Animals from the control group 2 (C2) did not receive any antibiotics or probiotics. Expression of IL-8 and IL-10, TNF $\alpha$  in the mesenteric nodes was studied by RT-PCR. The phagocytic activity of the leukocytes from peripheral blood of animals was investigated by reacting with staphylococci *in vitro*. The content of proinflammatory (Monocyte Chemoattractant Protein 1, MCP-1) and antiinflammatory cytokines (TGF- $\beta$  and IL-10), in blood serum was analyzed by ELISA. Condition of the mucosa in the small intestine was evaluated employing light and electron microscopy.

The signs of slight inflammation were revealed in all samples of mucosa except the C2 group. The number of white blood cells in these samples was increased (mainly due to the fraction of lymphocytes). In group C1 a lot of destroyed microvilli were determined on the surface of the majority of epithelial cells, the intercellular space was increased and the tight junction was destroyed. In the groups C2, E and B epithelial cells were in a physiologically active state having classical topography. Expression of proinflammatory cytokine IL-8 was the highest in groups C1 and L. Expression of IL-10 was higher in the groups B and L when comparing with other groups. In all the groups, excluding group C2 the elevation of serum titers of MCP-1 was determined. The content of IL-10 and TGF- $\beta$  was increased only in the samples of group E. Phagocytic index of peripheral blood phagocytes was the greatest in the groups E (54.2) and B (42.3), slightly less than in groups C2 (32.4) and L (26, 6). This index was minimal in the group C1 (18,7).

The changes in the intestinal mucosa after the treatment with antibiotics were accompanied by significant shifts in the

immunity system (local and systemic) causing both activation and suppression of inflammatory responses in a strain-specific manner. The recovery of the intestinal mucosa and immunological parameters was relatively slow and was not the same under the influence of different probiotics.

Work was supported by grant 13-04-01861 and State Contract 8418-7/2014.

#### **A016 CONTRIBUTION OF GUT MICROBIOTA IN METABOLIC DISEASES. EVIDENCE FROM GNOTOBIOLOGY**

**Ph. Gerard**

*INRA, Micalis UMR 1319, Food and Gut Microbiology for Human health*

An increasing body of literature has been recently generated identifying gut microbiota as a new environmental factor contributing to obesity and associated disorders. An important part of these studies has been performed using germfree (GF) animals. It was first demonstrated that GF C57BL/6J mice gained less weight than conventional mice when given a sugar- and lipids-rich diet despite greater food consumption. Concurrently, colonization of GF mice by a gut microbiota from conventional mice produced an increase in body fat content. Finally, transplantation of cecal microbiota from ob/ob mice to GF wild-type recipients led to higher fat mass gain than in mice inoculated with the gut microbiota from lean donors. Later, it was further showed that GF mice receiving a high-fat diet (HFD) showed enhanced insulin sensitivity with improved glucose tolerance and reduced insulinemia.

More recently, we developed a strategy based on gut microbiota transplantation from conventional to GF mice in order to demonstrate the role of the gut microbiota in the development of obesity associated metabolic disorders (including insulin resistance or non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)). By transplanting the gut microbiota from two mice with opposite response to HFD to two groups of GF mice, we demonstrated that susceptibility to diet-induced hyperglycemia and hepatic steatosis are transmissible *via* gut microbiota transplantation. These results support the idea that targeting the gut microbiota could be a new prevention or therapeutic approach for improving type 2 diabetes and NAFLD.

#### **A017 MICROBIOTA OF THE LARGE INTESTINE OF CHILDREN – RECIPIENTS AND ITS ETIOLOGIC SIGNIFICANCE IN BACTEREMIA AFTER LIVER TRANSPLANTATION**

**E.M. Gorskaya, T.S. Spirina**

*«Academician V.I. Shumakov Federal Research Centre of Transplantology and Artificial Organs», Moscow, Russian Federation*

**The aim of the study** is to establish the connection of microecological disturbances in large intestine of the children – recipients of the transplantates of hepatic lobes from a relative donor with bacteremia aetiopathogenesis

**Materials and methods.** The microbial ecology of large intestine of 235 children (1-17 years old) suffered from liver cirrhosis was studied before surgery. After surgery in the presence of bacteremia the blood was examined; trachea secretion and intravascular catheters. Microbiological study of biosubstratus and large intestine contents was performed by the standard method. The blood was cultured in a BactAlert device (BioMerieux, France); bacteria identification was studied with the use of automated system BBL Crystal MIND. Sensitivity of isolates of

opportunistic bacteria to antibiotics was investigated by a diffusion test on *Mueller–Hinter* medium in accordance with the standards of NCCLS.

**Results.** Profound disorders in microbiota of the large intestine were revealed in all the children before surgery. It was observed a decrease for 2 and more levels (lg) bifidobacteria (in 80-100% of children), lactobacillus (in 50%) and colibacillus (in 80%). The level of opportunistic bacteria in large intestine contents far exceeded permissible limits. Among the aerobic microorganism 80% were gram-negative bacteria, mainly, different species of enterobacteria. More frequently were isolated strains of *K. pneumonia* (7-8 lg KOE/g). Nonfermentative gram-negative bacteria, including *P. aeruginosa* had low frequency or were not detected. Among gram-positive opportunistic bacteria were found coagulase-negative staphylococcus (CNS) (8%) and staphylococcus aureus (4%). The patients with bacteremia subsequently discharged from the hospital more often were isolated CNS from blood. From blood of the dead children with bacteremia were isolated *P. aeruginosa* (44%) and *K. pneumoniae* (36%). Children with a fatal case were isolated *Klebsiella* in large intestine, trachea and catheters; *Ps. aeruginosa* predominantly in trachea and catheters. All isolated from the dead children opportunistic pathogenic bacteria had polyresistance to antibiotics.

**Conclusion.** In accordance with the received results one can conclude that *P. aeruginosa* in the presence of bacteremia had extraintestinal origin, and *K. pneumoniae* – both intestinal and extraintestinal origin.

#### A018 DIFFERENT ANTIFUNGAL STRATEGIES OF LACTIC ACID BACTERIA

T. Haertlé, J.-M. Chobert

*Biopolymères Interactions Assemblages, Institut National de Recherche Agronomique, équipe Fonctions et Interactions des Protéines, Nantes, France*

Antifungal activity of lactic acid bacteria (LAB) has been observed in many food fermentation processes. It is due to different factors *Enterococcus durans* A5-11 is a lactic acid bacteria (LAB) strain isolated from traditional Mongolian airag cheese. This strain inhibits the growth of a wide range of microorganisms, mostly bacteria and some fungi including *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Fusarium graminearum* CBS18532, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida pseudotropicalis*. It produces two bacteriocins, named durancin A5-11a and durancin A5-11b, which were previously purified and characterized and have similar antimicrobial properties. Mass spectrometry analysis demonstrated molecular masses of 5206 Da and 5218 Da, respectively, corresponding to 43 and 44 amino acids for durancin A5-11a and durancin A5-11b, respectively. Difficulty to purify high amounts of durancins from bacterial supernatant and to separate their two forms, led to apply chemical synthesis to produce it in bigger quantities. The whole durancins A5-11a and A5-11b, as well as their N-terminal (21 amino acids) and C-terminal fragments (22 and 23 amino acids) were synthesized and their antifungal properties studied. C-terminal fragments of both durancins showed stronger antifungal activities than both N-terminal parts and whole bacteriocins. Treatment of *Debaryomyces hansenii* with 2 mM of different synthetic peptides led to the loss of the membrane integrity and to several ultra-structural changes in the yeast cells.

Antifungal compounds produced by *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3N.1p isolated from raw cow

milk are of different character. A fermentation process with immobilized cells of the protective culture of *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3N.1p in enriched milk protein medium in the presence of *Debaryomyces hansenii* UBOCC-A-211003 and *Kluyveromyces lactis* UBOCC-A-212021 was developed. After seven days of fermentation, active cell-free culture supernatants with robust antifungal activities against *Debaryomyces hansenii*, *Penicillium expansum* and *Penicillium roqueforti* were observed. Active cell-free culture fractions collected during the batch fermentation process contained high amounts of organic acids such as lactic and acetic acids as well as hexanoic acid (9 mM), which revealed to be the most important antifungal component in these samples. Even if organic acids are key antifungal agents, they are a part of complex mixtures of various molecules produced by *Lb. harbinensis* K.V9.3N.1p strain, acting in a synergic manner.

The obtained results show different strategies in their competition with fungal co-infections applied by LAB during their growth.

#### A019 EFFECTS FROM THE ENVIRONMENT AND NUTRITION ON EPIGENETIC REGULATION OF INFLAMMATORY RESPONSES

A.G. Haslberger

*Department of Nutritional Sciences, University of Vienna, Austria*

For most complex diseases genetic as well as environmental causes have been acknowledged. Gene-environment interaction may especially involve elements of the epigenetic regulation. Toxin and stress factors from the environment as well as food ingredients or diets have been identified as modulators of the epigenetic control of gene expression.

In the metabolic syndrome changes in the composition of gut microbiota are believed to contribute to an increased permeability of the intestinal wall and low grade inflammation but also an increased production of reactive oxygen species (ROS) and DNA damage. The anti-oxidative and epigenetic effects of various plant ingredients are under investigation for a modulation of the epigenetic control of inflammatory molecules and DNA repair enzymes. Vitamin and antioxidant rich diet increased MLH1 promoter DNA methylation in DMT2 subjects.

Changes in gut microbiota and diet are also known to induce alterations in the synthesis of short chain fatty acids such as butyrate by various bacterial groups. Butyrate synthesis was recently shown to affect inflammation regulated by Treg cells in the gut involving epigenetic mechanism.

We therefore, compared changes in gut microbiota with epigenetic regulation of molecules involved in inflammatory responses of metabolic syndrome, especially free fatty acid receptor FFA3, Toll like receptors (TLRs), TNFA and IL-6. Microbiota were analyzed for abundance and diversity by PCR-DGGE, qPCR and 454-pyrosequencing. Epigenetic methylation of 3–7 CpG sites in promoter regions of TLR2, TLR4, FFAR3, TNF- $\alpha$ ; and Line1, as a marker for global methylation, were analyzed using bisulfite conversion and pyrosequencing.

In type 2 diabetes and obesity the diversity of band patterns was decreased compared to healthy controls. Firmicutes/Bacteroidetes ratio, abundance of lactic acid subgroups and Enterobacteria increased during the intervention period in type 2 diabetes. In contrast, the ratio of Firmicutes/Bacteroidetes was decreasing in obese patients with weight loss.

We identified a significant decreased methylation in CpG promotor regions of TLR2, TLR4, FFAR3 and TNFa and IL-6 in obesity but also decreased CpG methylation in diabetics, (TLR2: obese: 2,96%, TLR4: obese: 4,30%, FFAR3: diabetes: 31,75%; obese: 32,51%). CpG methylation of Line 1, reflecting genome wide methylation, did not show significant changes between the groups. We also we found a significant correlation between an increased BMI/WHR and decreased methylation of TLR2, TLR4, FFAR3 and IL-6.

Conclusions: Our results suggest that a different composition in microbiota in obesity and type 2 diabetes modulate the epigenetic regulation of inflammatory molecules, including CpG methylation in parallel to histone modification. Interactions between microbiota and epigenetic regulation may involve NF-kB signaling from TLRs as well as SCFA binding to SCFA-receptors. Modulation of SCFA synthesis by diets but also intervention with various polyphenols may therefore be a way to interfere with the epigenetic regulation in inflammatory responses. The significant correlations of anthropometric measurements with TLR2, TLR4, FFAR3 or could develop into useful markers.

#### **A020 THE ROLE OF DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING IN CONTROLLING DRUG RESISTANT TUBERCULOSIS: CHALLENGES AND POSSIBILITIES**

S. Hoffner

Karolinska Institute and the Public Health Agency of Sweden, Stockholm, Sweden

Severely drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* is increasingly recognized as an important public health concern. In some settings the prevalence of multidrug resistant (MDR) TB is close to 50% with one third of newly detected cases infected with MDR-TB strains. Increased use of reliable and timely diagnostic methods to detect resistance to rifampicin + isoniazid (multi-drug resistance (MDR), and to fluoroquinolones + second line injectable drugs (extensively drug resistance (XDR) is thus urgently needed.

With today's knowledge, the available diagnostic tools and the serious M/XDR-TB situation, it cannot be considered acceptable to have to wait for 8 to know if a clinical isolate is drug susceptible or not. Unfortunately, isolation and subsequent DST on solid media is still a commonly used algorithm. There are more rapid culture based alternatives, but I believe the future is molecular assays.

Besides a number of locally developed assays, there are mainly two commercial systems; GeneXpert from Cepheid and Line probe assays (LPA) from Hain Life Science. The Xpert system is most rapid and developed to be easy to use. It offers simultaneously detection of *M tuberculosis* and resistance to rifampicin in smear positive sputum samples. Often rifampicin resistance is seen as a proxy for MDR-TB, but this is not always the case. We should thus aim at examining more than this drug. If a strain is rifampicin resistant – we need to combine the remaining drugs in an effective way, if it is susceptible – we risk to fuel the development of MDR by (undetected) resistance to isoniazid and other first line drugs.

LPA investigates resistance to both rifampicin and isoniazid, but is somewhat more time consuming and more laborious to perform. Both assays have demonstrated very good specificity and sensitivity. An exception is in so called hetero-resistant TB, when a patient harbors both susceptible and resistant bacteria. In these cases, culture based DST has shown better sensitivity.

Further development of molecular assays and additional characterization and improvements of existing tests should

be given priority. Each country should develop national diagnostic algorithms for how and when rapid molecular assays should be introduced to ensure a correct and timely support to the fight against M/XDR-TB.

#### **A021 IN VITRO ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AGAINST FUSARIUM SPP. ISOLATED FROM HUMAN KERATITIS**

M. Homa<sup>1</sup>, I.F. Pálma<sup>1</sup>, Y. Randhir Babu Singh<sup>2,3</sup>, C.S. Shobana<sup>2</sup>, P. Manikandan<sup>3</sup>, L. Kredics<sup>1</sup>, C. Vágvölgyi<sup>1</sup>, L. Galgóczy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Szeged, Faculty of Sciences and Informatics, Department of Microbiology, Középfasor 52., H-6726 Szeged, Hungary

<sup>2</sup>Dr. G. R. Damodaran College of Science, Department of Microbiology

<sup>3</sup>Aravind Eye Hospital and Postgraduate Institute of Ophthalmology, Department of Microbiology, Avinashi road, Coimbatore 641 014, Tamilnadu, India

*Fusarium spp.* are the most frequently isolated causative agents of keratitis in South India. Due to the great number of antifungal resistant *Fusaria*, new, alternative therapeutic agents are extremely needed. Essential oils and their compounds are considered as potential antifungal agents.

The aim of this study was to investigate the antifungal effect of 9 essential oils (*Cinnamomum zeylanicum*, *Citrus limon*, *Eucalyptus citriodora*, *Gaultheria procumbens*, *Juniperus communis*, *Melaleuca alternifolia*, *Origanum majoranna*, *Salvia sclarea* and *Thymus vulgaris* oil) and their combination with antifungals in broth microdilution test against the most common etiologic agents of *Fusarium* keratitis in South India. The metabolic inhibition effect of the most active oil and its component was investigated by FUN-1 staining.

The lowest minimal inhibitory concentration values were observed in the case of *C. zeylanicum* oil (CZO) and its main component, trans-cinnamaldehyde (tCA). Whereas, the *C. limon* oil was the least effective. Interaction tests revealed mostly no interaction between tCA and natamycin. FUN-1 staining revealed that CZO and tCA cause reduced cellular metabolism.

According to our results CZO and tCA could be potentially used in the treatment of *Fusarium* keratitis.

The research of M.H., Cs.V. and L.G. was supported by the European Union and the State of Hungary, co-financed by the European Social Fund in the framework of TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 'National Excellence Program'. The relating research groups were also supported by the INSA-HAS interacademic bilateral project (SNK-49/2013) providing infrastructure and research equipment.

#### **A022 THE EFFECT OF PREBIOTICS AND PROBIOTICS ON CAMPYLOBACTER AND THE CAECAL MICROBIOME OF BROILER CHICKENS**

A.S. Horton<sup>1</sup>, T. Wilkinson<sup>1</sup>, D.K. Leemans<sup>1</sup>, V.J. Theobald<sup>1</sup>, S.T. Calus<sup>1</sup>, M.J. Hegarty<sup>1</sup>, S. Gaunt<sup>2</sup>, G. Evans<sup>3</sup>, R. McDowell<sup>2</sup>, A. Shearer<sup>3</sup>, M. R. F. Lee<sup>1</sup>, J. Newbold<sup>1</sup>, N. Scollan<sup>1</sup>, J.A. Pachebat<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences, Aberystwyth University, UK

<sup>2</sup>Eminate, Sutton Bonington, Leicestershire, UK

<sup>3</sup>Neem Biotech, St. Mellons, Cardiff, UK

*Campylobacter species* are the leading cause of bacterial gastro-enteritis in the industrialised world. These bacteria thrive in the avian gut and the primary source of human infection is through the food chain. Here we report on the use of the prebiotics and probiotics, to reduce the load of thermotolerant *Campylobacter spp.* in Ross 308 broiler



chickens. The caecal contents of commercial chickens fed a normal diet, supplemented with or without the pre- or pro-biotics, were extracted on days 14, 21, 28 and 36 of the trials and examined using Ion Torrent pyrosequencing of variable regions 1 and 2 of the 16S rRNA gene and Illumina metagenomic sequencing. We discuss the potential to reduce levels of *Campylobacter* present in chicken caeca. This study also provides a snap-shot of the chicken caecum microbial community and the modulations of this microbiome in response to the interventions in poultry feed.

### **A023 DISTRIBUTION OF MYCOBACTERIA IN HOUSEHOLD WATER OF HEALTHY VOLUNTEERS**

**T. Ichijo**

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka, Japan*

**Introduction:** Nontuberculous mycobacteria (NTM) diseases have been observed in most industrialized countries. The primary infectious source of NTM appears to be environmental exposure, and it is indispensable to reduce the frequency of exposure from environmental sources for preventing NTM diseases. In order to achieve this, the distribution, abundance and physiological activity of NTM in the environments must be clarified. In this study, we determined the abundance and estimated the physiological activity of mycobacteria in the household water system of healthy volunteers using quantitative PCR and a fluorescent staining method<sup>1)</sup>, because household water has been considered as one of the possible infectious sources. We evaluated whether each sampling site (bathroom drain, kitchen drain, bath heater pipe and showerhead) have the potential to be the infectious sources of NTM diseases.

**Methods:** We chose healthy volunteer households in order to lessen the effect of possible residential contamination from an infected patient. In each individual's residence (39 healthy volunteers), we collected biofilms from 4 points including the surfaces of the showerhead, two drains (kitchen and bathroom) and the bathtub heater pipe. 16S rRNA gene targeted quantitative PCR was used for quantification of total bacteria, *Mycobacterium* spp., *M. avium* and *M. intracellulare*. Auramine O-CTC double staining method<sup>1)</sup> was used for visualization of respiratory active mycobacteria.

**Results and Discussion:** Drains in the bathroom and kitchen sink are the niche for *Mycobacterium* spp. and *M. avium* cells were only detected in the bathtub inlet. Both physicochemical and biologic selective pressures may affect the preferred habitat of *Mycobacterium* spp. Regional differences also appear to exist as demonstrated by the presence (US) or absence (Japan) of *Mycobacterium* spp. on showerheads. Understanding of the country specific human activities and water usage will help to elucidate the infectious source and route of nontuberculous mycobacterial disease.

**Acknowledgements:** This work was supported by the Grant in Aid for Scientific Research (A) (20249007) promoted by the JSPS.

### **A024 ALTERATION OF GUT MICROBIOTA BY PROBIOTICS ADMINISTRATION MODULATES HYPER-IMMUNE DISORDERS**

**S.-H. Im**

*Academy of Immunology and Microbiology (AIM), Institute for Basic Science (IBS), Pohang, Republic of Korea; Division of Integrative Biosciences and Biotechnology (IBB), Pohang University of Science and Technology, Pohang, Republic of Korea*

Alteration of gut microbiota composition is associated with diverse immune disorders and restoration of dysbiosis

in disease state with beneficial microorganism could confer the health benefits. However it is still unclear which types of microorganism have beneficial effect in maintaining healthy condition or restoring dysbiosis of pathophysiological conditions. Definition of beneficial microorganisms should be different depending on the types of diseases and health condition of individual person. In our lab, we have been interested in developing probiotics that could suppressing hyper-immune disorders To selectively identify probiotic strains that could enhance the generation of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs), we have developed *ex vivo* screening systems. Probiotic strains with IL-10<sup>high</sup>IL-12<sup>low</sup> Foxp3<sup>high</sup> inducing property were selected and combined. Using the system, we identified a mixture of probiotics (IRT5) that up-regulates Tregs *in vivo*. Administration of the IRT5 induced both T-cell and B-cell hyporesponsiveness and down-regulated T helper (Th) 1, Th2, and Th17 cytokines without apoptosis induction. It also induced generation of CD4(+)Foxp3(+) Tregs from the CD4(+)CD25(-) population and increased the suppressor activity of naturally occurring CD4(+)CD25(+) Tregs. Conversion of T cells into Foxp3(+) Tregs is directly mediated by regulatory dendritic cells (rDCs) that express high levels of IL-10, TGF-beta, COX-2, and indoleamine 2,3-dioxygenase. Administration of probiotics had therapeutic or prophylactic effects in experimental disease models of inflammatory bowel disease and in non-mucosal immune disorders such as atopic dermatitis, hapten-induced contact hypersensitivity, rheumatoid arthritis, myasthenia gravis and multiple sclerosis. The immunoregulatory effect of the IRT5 probiotics is associated with enrichment of CD4(+)Foxp3(+) Tregs in the inflamed regions. Collectively, the administration of probiotics that enhance the generation of rDCs and Tregs represents an applicable treatment of inflammatory immune disorders. This study was supported from the grants funded by Research Program for Agricultural Science & Technology Development (PJ907153)", National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration and the Institute for Basic Science, Republic of Korea.

### **A025 WHOLE-GENOME BASED PHYLOGENETIC ANALYSIS OF MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX REVEALS EVOLUTIONARY FORCES LEADING TOWARD A BETTER FITNESS FOR NICHE SPECIFIC ADAPTATIONS**

**T. Iwamoto**

*Department of Infectious Diseases, Kobe Institute of Health, Japan*

*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (Mah) is the most common agent of both, human and pig mycobacteriosis. We previously reported that the zoonotic risk of Mah is much higher in Europe than in Japan, and in Japan, its fitness for niche specific adaptations assumed to be augmented. Here, we applied whole-genome based phylogenetic analyses for various isolates of *M. avium* complex (MAC) and determined a novel aspect of the delineation of MAC species/subspecies corresponding to their putative host tropism.

The genomes of our 7 isolates (4 from human, 2 from pig, 1 from bathroom) were sequenced by using Illumina technology. For comparative analyses, we downloaded the genome sequences of 33 strains (Mah [n = 4], *M. avium* subsp. *avium* (Maa) [n = 2], *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) [n = 22], *M. intracellulare* [n = 4], and *M. indicus pranii* [n = 1]) from PATRIC database. The 40 genome sequences were annotated/re-annotated using the RAST pipeline. The coding sequences (CDSs)

present in a single copy in each of the 40 genomes were explored using PGAP. We further selected CDSs with a low probability of recombination. The subsets of amino acid sequence from each strain were concatenated and maximum likelihood analyses were conducted with 100 bootstrap replicates using RAxML.

The whole-genome based phylogenetic classification revealed genetic similarity among Map bovine-type isolates from different sources. On the other hand, other Map types (sheep type and Indian bison type) showed distinct sister groups. Eleven Mah strains were divided into three distinct sister groups. Interestingly, one group shared a recent common ancestor with a Maa strain ATCC 25291, which indicated an independent divergence from the other two groups. All isolates in this group were isolated from animals (mainly pigs), except one, which was isolated from a patient with AIDS. Hence, we named the group as «animal type». One of the other two Mah groups showed a large genome inversion (spanning about 1.8Mb) which was not observed in other MAC strains and their ancestral *M. indicus pranii*. We classified this group as «emerging type». It might evolve to have better adaptation in humans. The third group was classified as "traditional type" since they showed typical *hsp65* code type 2 and ancestral MACPPE12 gene sequence. Mah should be closely monitored from global epidemiological standpoint.

#### A026 COMPARISON OF GENOME SEQUENCES BETWEEN MYCOBACTERIUM LEPRAE PREPARED BEFORE AND AFTER PASSAGING IN NUDE MICE FOOTPAD

M. Kai<sup>1</sup>, N.T. Sekizuka<sup>2</sup>, A.A. Maghanoy<sup>3</sup>, M.F. Balagon<sup>3</sup>, P. Saunderson<sup>3</sup>, M. Makino<sup>1</sup>, M. Kuroda<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Mycobacteriology, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases

<sup>2</sup> Pathogen Genomics Center, National Institute of Infectious Diseases

<sup>3</sup> Leonard Wood Memorial, Cebu, The Philippines

**Introduction.** *Mycobacterium leprae* can not be cultivated in artificial medium although it was identified in 1873. For the growth of *M. leprae*, it is needed to passage the bacilli in armadillo or nude mice footpad. Such difficulties have inhibited the progress of detailed microbiological studies of leprosy. However, recent advancement in genetical techniques made us possible to determine the genome sequences of *M. leprae* strains. We also determined the complete genome sequence of Japanese isolate of *M. leprae* recently. *M. leprae* were prepared from nude mice for genome analysis. However, it is unknown whether there are any differences between *M. leprae* isolated from patients' biopsy and passaged *M. leprae* in nude mice footpad. Here, we compared genome sequences prepared from the both sources, human biopsy and nude mice.

**Methods.** Biopsy was derived from leprosy patient in Cebu, Philippines. One of the samples, named Cebu-3 was divided into two groups. One group was directly used for genome analysis (Cebu-3h) and another was injected into nude mice footpad to be propagated. After one-year growth in nude mice, *M. leprae* was extracted from the nude mice footpad and the DNA was extracted for genome sequencing (Cebu-3m). Genome sequence was determined by using Illumina GAIIX machine and the sequenced reads were mapped to the published complete genome sequence for *M. leprae* TN strain.

**Results.** Genome analysis of the *M. leprae* Cebu-3m revealed characteristic single nucleotide polymorphism

(SNPs). The genotyping of Cebu-3m was similar to TN that is type IIIA. The genome sequences of Cebu-3h and Cebu-3m were completely identical except several SNPs. The locations on genome sequence of such SNPs were in the non-coding region.

**Conclusion.** The genome sequence of *M. leprae* isolate, Cebu-3, was determined. And the genome sequences from Cebu-3h and Cebu-3m were compared. Although the sequences of Cebu-3h and Cebu-3m were almost identical, there were three different SNPs. The locations on genome of such SNPs were in the non-coding region. And the two of them were in repeated unit, so-called RLEP. RLEP is specific for *M. leprae* and is not found in other mycobacteria. This result suggests the SNP in RLEP region might be important for *M. leprae* genome evolution.

#### A027 BIOFILM FORMATION AND BACTERIAL PATHOGENESIS

S. Kamiya<sup>1</sup>, H. Yonezawa<sup>1</sup>, T. Osaki<sup>1</sup>, K. Sugisaki<sup>1</sup>, T. Hanawa<sup>1</sup>, H. Matsuda<sup>2</sup>, S. Nakamura<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Infectious Diseases,

<sup>2</sup>Chariman of the Trustees, Kyorin University School of Medicine, Mikata, Tokyo,

<sup>3</sup>President, Kanazawa University, Kanazawa, Ishikawa, Japan

When bacteria transit from a planktonic state to a lifestyle in which the microorganisms are firmly attached to biotic or abiotic surfaces, biofilm development is initiated. Biofilms are strongly implicated in bacterial virulence and biofilm infectious diseases are clinically problematic from therapeutic point of view. Biofilm formation is critical not only for environmental survival but also for successful infection by numerous pathogenic bacteria. Among human bacterial pathogens, the biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, pathogenic *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, staphylococci and streptococci are some of the best studied. Bacterial biofilms are frequently embedded in a self-produced extracellular matrix. The extracellular polymeric substance (EPS) matrix, which can constitute up to 90% of the biofilm biomass, is a complex mixture of exopolysaccharides, proteins, DNA and other macromolecules.

In the present study, correlation between biofilm formation and bacterial pathogenesis is shown in *Helicobacter pylori* and *Bordetella pertussis*. Our previous studies have alluded to the ability of *H. pylori* to form biofilms. A polysaccharide-containing biofilm has been observed at the air-liquid interface when *H. pylori* was grown in a glass fermenter. *H. pylori* is also capable of binding to a heterotrophic mixed species biofilm grown on stainless steel coupons. Recent studies indicated that 10 strains including some animal-adapted strains, clinical isolates and laboratory strains, were able to form similar three-dimensional architectures implicated in biofilm development. In addition, we characterized the ability of 4 reference strains and 4 clinical isolates of *H. pylori* to form biofilms. Furthermore, we investigated the potential role of outer membrane vesicles (OMV) released from this organism in biofilm development. In *B. pertussis*, it was demonstrated that the stringent response mediated by the accumulation of cellular (p) ppGpp is closely associated with biofilm formation as the biofilm formation was significantly decreased by stringent response lacking *rel A* negative and *spoT* negative mutant.

## A028 LACTIC ACID BACTERIA AND YEAST FROM IRANIAN TRADITIONAL DAIRY BEVERAGE

F.S. Karimpour<sup>1,2</sup>, A.M. Isakhanyan<sup>2</sup>, T.V. Khachatryan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>University of Medical Sciences, Food & Drug and Social Determinants of Health Research Center, Iran

<sup>2</sup>SPC «Armbiotechnology» of the NAS, Armenia

In recent years, special attention has been focus to the study of microflora of traditional fermented dairy products and creation of new products based on them (solitary or associated). In this context the isolation of lactic acid bacteria (LAB) and yeasts from three different samples of the «Richal» beverage (Masti, Shiri, Dooghi), produced in natural farms of the Southern region of Iran, are of interest. For the first time 77 strains of LAB and 12 strains of yeast have been isolated and some of their probiotic properties were shown. Genotyping of the selected strains of LAB and yeast was defined by method of sequence of 16S RNA for *Lactobacillus pentosus* F85, *Lactobacillus plantarum* F81, *Lactobacillus plantarum* F15 and 26S RNA for *Kluyveromyces marxianus* FA25 and *Kluyveromyces marxianus* sp. FA13 yeast strains.

For the creation of functional nutrition products, combined cultivation of LAB with probiotic properties in different conditions were studied according to Iranian dairy products standard. The selected combination includes *L. pentosus* F85, *L. plantarum* F81, *L. plantarum* F15 strains can be perspective candidates for creation of new functional food products. The combined growth of the LAB and yeasts strains with antimicrobial properties were carried out. The best results were obtained at the combined growth of LAB *L. pentosus* F85 and *L. plantarum* F15 with yeasts *Kl. Marxianus* sp. FA13. The obtained data showed, that at the combined growth of bacteria and yeasts, the cultivation conditions (medium composition, time of growth, genera of yeasts) affected the display of antimicrobial activity – increase of efficiency of test culture growth inhibition was observed. The technological scheme for production of a complex preparation with antimicrobial properties based on the combined LAB and yeasts growth has been developed. The obtained organoleptic, physicochemical, microbial and market condition parameters research data may serve the basis for thorough elaboration of the production technology for obtaining products of functional assignment of a new generation.

## A029 COMPARATIVE GENOMICS OF PROBIOTIC BACTERIA AND THE DEVELOPMENT OF NOVEL ANTIMICROBIALS

A.V. Karlyshev<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Federal State Budget Institution «The V.I. Kulakov's Scientific Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

<sup>2</sup>School of Life Sciences, SEC Faculty, Kingston University, London, Kingston upon Thames, United Kingdom

Emergence of multidrug resistant forms of various microbial pathogens imposes a huge health problem. One of the main reasons for the spread of antibiotic resistance is excessive application of conventional antibiotics in farming industry. For example, wide usage of tetracycline in poultry farms resulted in many strains of *Campylobacter* bacteria (the main causative agent of gastrointestinal diseases in humans) being resistant to this antibiotic. A search for alternatives to common antibiotics is a timely and challenging task. Among traditional approaches is an empirical testing of naturally occurring antibacterial compounds

(e.g. from plant extracts), which is mostly based on a 'trial and error method', searching for compounds with mainly bactericidal action. Another approach is to target specific pathogenicity traits (non-bactericidal action). Advantages: elimination of bacteria without a risk of anaphylactic shock caused by lysis and endotoxin release; less risk of development of drug resistance. Examples: antitoxins and protease inhibitors, inhibitors of quorum sensing and type three secretion systems, as well as other compounds targeting bacterial interaction with host cells. Inhibition of bacterial adhesion in the presence of monosaccharides has been known for decades. Classical example: type 1 fimbria-dependent adhesion of *E. coli* is inhibited by mannose. More recent studies allowed the design of various other small molecules as inhibitors of bacterial adhesion. In particular, investigation of interaction of glycoprotein adhesins of *Campylobacter jejuni* with host cell receptors, using a novel *in vitro* assay, allowed the detection of various genes and factors required for bacterial interaction with host cell receptors. The studies demonstrated promising results in the development of a new class of specific antibacterial agents based on small molecules mimicking certain structures (e.g. glycans) present on host cell receptors or bacterial adhesins. An alternative approach is to use certain probiotic strains competing with microbial pathogens for binding with host cells. Our genome sequencing projects led to the identification of specific adhesins and other remarkable features of probiotic bacteria. Comparative genome analysis of various promising probiotic strains allowed the detection of novel adhesin-encoding genes, contributing to beneficial properties of these strains. In particular, a plasmid-borne gene, encoding an unusually large collagen binding adhesion, was discovered in *L. fermentum* strain 3872. The role of this adhesin in the bacterial life style was suggested. Genome sequencing was conducted using IonTorrent PGM. The data were analysed using CLC Genomics Workbench bioinformatics tools.

## A030 ANTIDRUG BACTERIAL RESISTANCE IN RESPIRATORY TRACT BIocenosis IN CHILDREN

G.N. Kholodok, V.K. Kozlov

Research Institute of Mother and Child Health Care, Khabarovsk – Khabarovsk Branch

of the Far-Eastern Research Center of Respiratory Physiology and Pathology,

Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences

324 bacterial strains isolated from respiratory discharge of children with community-acquired pneumonia were examined. Strain resistance of *Streptococcus pneumoniae* (n=68) was identified to 20 antimicrobial drugs (AMD) by a serial dilution method, that of *Haemophilus influenzae* (n=82), *Staphylococcus aureus* (n=79), *Escherichia coli* (n=74) and *Klebsiella pneumoniae* (n=21) – by a disc-diffusion method. Standard culture media (Bio-Rad) and discs with AMD (HiMedia) were used. Size of growth inhibition zone around AMD discs (in millimeters) was measured and interpreted in conformity with CLSI standards.

The total rate of detection of *S. pneumoniae* strains resistant (7.4%) and moderately resistant (17.6%) to penicillin made 25.0%; resistance to macrolides amounted to 17.5%, which was 2-3 times higher than Russia's average. Distribution analysis of penicillin MICs for *S. pneumoniae* showed circulation of three pneumococcal subpopulations. Penicillin MIC mode is equal to 0.03 mg/L, which was twice as much as wild pneumococcal strain value (0.015 mg/L). MIC<sub>50</sub> (0.03 mg/L) was within a range of sensitivity,

MIC<sub>90</sub> (0.5 mg/L) – within a range of moderate sensitivity. Amoxicillin was active against 94.4% of strains. MIC<sub>50</sub> (0.03 mg/L) and MIC<sub>90</sub> (0.125 mg/L) were within a range of sensitivity. Multidrug resistance was typical of 36.8% of the *S. pneumoniae* strains examined, but all of them were sensitive to third-generation cephalosporines, respiratory fluoroquinolones and chloramphenicol, levofloxacin, ertapenem, linezolid and vancomycin in 95-100% of cases. *H. influenzae* resistance to ampicillin made 30.9%, *E. coli* resistance to ampicillin – 73.0%. Production of  $\beta$ -lactamases in *H. influenzae*, *E. coli* and *K. pneumoniae* was detected in 37.5%, 68.7% and 70.0% of cases, respectively. Macrolides (83%), lincomycin (88%) and vancomycin (100%) were active against staphylococci; resistance to ampicillin made 70%. Third-generation cephalosporines, carbapenems, and respiratory fluoroquinolones were active against majority of pneumotropic infective agents, though strains resistant to those antibiotics were also detected.

Thus, the principal pathogens of respiratory tract biocenosis were found to have an elevated level of drug resistance. This is indicative of unfavorable state of respiratory biocenosis, high risk of resistance spread over other human body biotopes, higher risk of respiratory diseases caused by resistant infective agents in children.

### A031 NEW STEP TOWARDS UNDERSTANDING THE ROLE OF PROBIOTIC MICROORGANISMS IN PATHOGENESIS OF AUTOIMMUNE THYROID DISEASES

E.P. Kiseleva<sup>1</sup>, K.I. Mikhailopolu<sup>1</sup>, G.I. Novik<sup>2</sup>, Y.A. Knirel<sup>3</sup>

<sup>1</sup> The Institute of Bioorganic chemistry, NAS of Belarus, Minsk, Belarus

<sup>2</sup> The Institute of Microbiology, NAS of Belarus, Minsk, Belarus

<sup>3</sup> N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry RAS, Moscow, Russia

The idea to use probiotics for prevention/treatment of human autoimmune diseases (AD) is popular and supported by the known ability of probiotics to reduce AD via induction of regulatory T cells. We hypothesize that probiotics could act as targeted therapeutics to block autoimmune response via molecular mimicry mechanism.

We found at the first time that bifidobacteria and lactobacilli contain the biopolymers (BP) that selectively bind human autoantibodies to thyroïd peroxidase (TPO) and thyroglobulin (Tg), anti-TPO and anti-Tg, respectively. The BP were isolated from the soluble fraction of *Bifidobacterium bifidum* BIM B-733D and *Lactobacillus plantarum* BIM B-423D by affinity chromatography with anti-TPO (BP<sub>anti-TPO</sub>) or anti-Tg (BP<sub>anti-Tg</sub>), purified by size exclusion chromatography on TSK HW 40 gel and identified as linear  $\alpha$ -1,6-glucans by two-dimensional NMR spectroscopy including <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H COSY and <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C HSQC experiments. Unlike the known dextrans from lactic acid bacteria, BP<sub>anti-TPO</sub> and BP<sub>anti-Tg</sub> are characterized by (1) low and regular molecular weight (5 – 7 kDa) and (2) the complete absence of side chains that is typical only for a unique dextran from *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. The ability of BP<sub>anti-TPO</sub> and BP<sub>anti-Tg</sub> (i) to distinguish anti-TPO (anti-Tg) from other IgG and (ii) to compete with TPO (Tg) for binding of anti-TPO (anti-Tg) was confirmed by ELISA.

We hypothesize that unique  $\alpha$ -1,6-glucan can be used as therapeutic to prevent thyroid gland destruction that in ATD pathogenesis occur through complement activation or antibody-dependent cell mediated cytotoxicity. The positive effect of BP<sub>anti-TPO</sub> and BP<sub>anti-Tg</sub> can be realized (1) via specific binding to receptors on B cells followed by blocking the

synthesis of anti-TPO and anti-Tg (antagonist effect) and (2) via binding to anti-TPO and anti-Tg (competition with TPO and Tg, that are abnormally expressed/presented on basal membrane of thyroid cells). This study will be extended by using of animal models and cell cultures.

### A032 ANTIBIOTIC RESISTANCE OF MICROFLORA, WHICH CAUSES INFECTIONS OF LOWER RESPIRATORY TRACT IN THE REPUBLIC OF CRIMEA

S.V. Kozulya<sup>1</sup>, E.V. Gontar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Public institution «Crimean State Medical University named after S. I. Georgievsky», Simferopol, Russia

<sup>2</sup>Public institution «Central regional hospital of Djankoi», Djankoi, Russia

The causative agent of infectious diseases of lower respiratory tract is more commonly *S. pneumoniae*; 48 strains were isolated (46.6% of isolates). Next agents in frequency of isolation are *Moraxella catarrhalis* (12; 11.7%), *Staphylococcus aureus* (10; 9.7%), *Candida albicans* (10; 9.7%), *Haemophilus spp.* (7; 6.8%), *Klebsiella pneumoniae* (8; 7.8%), *Pseudomonas aeruginosa* (5, 4.8%), and *Streptococcus agalactiae* (3, 2.9%).

Levofloxacin showed the highest efficiency for *S. pneumoniae* (100% strains were sensitive), Clindamycin demonstrated equally good results (97%). 85% strains sensitized to oxacillin, 52% – erythromycin. Majority of strains (65%) were resistant to tetracycline and co-trimoxazole.

Cefepime and meropenem showed the highest efficiency for *M. catarrhalis* (100%). However, ceftazidime and imipenem, relating to the same antibiotic group, showed efficiency only to 67% and 33% strains, in accordance. Ciprofloxacin and gentamicin were effective against 83% strains, but other representative of aminoglycoside group, amikacin was effective only in 67% strains.

*S. aureus* was a sensitive in 100% to levofloxacin, vancomycin, and oxacillin. Clindamycin (50%) and erythromycin (40%) were less effective. 90% of the strains were resistant to such antibiotics as gentamicin and penicillin.

*Haemophilus spp.* strains were a sensitive in 100% to ampicillin, amoxiclav, ceftriaxone and ciprofloxacin.

*K. pneumoniae* strains were a sensitive in 100% to ampicillin, 87% to ciprofloxacin, 62% to amokslava, ceftazidime and ceftriaxone, 33% to gentamicin.

*P. aeruginosa* strains were a sensitive in 100% to meropenem, imipenem, cefepime and ciprofloxacin. But only 60% of the strains were sensitive to amikacin and 40% – to ceftazidime and gentamicin.

*S. agalactiae* strains were a sensitive in 100% to clindamycin. 66% strains were sensitive to levofloxacin and erythromycin. 100% of these bacteria were resistant to chloramphenicol.

### A033 A COMPARATIVE ANALYSIS OF PROBIOTIC BACILLI STRAINS USED FOR A TRADITIONAL JAPANESE FOOD NATTO PRODUCTION

E.V. Kudryashova<sup>1</sup>, E.V. Ariskina<sup>1</sup>, N.V. Prisyazhnaya<sup>1</sup>, V.G. Melnikov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

<sup>2</sup>International Science and Technology Center, Moscow, Russia

Natto, a Japanese traditional food is made from soybeans fermented with bacilli. It has been established that these bacteria are assigned to *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*. Medicinal studies show that Natto has a favorable

effect on the human organism due to a special bacterial fibrinolytic enzyme (nattokinase or subtilisin).

In this work DNA-typing method (BOX-PCR, REP-PCR) and a matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry have been applied for a comparative analysis of the strains used for Natto production, and type strain *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* VKM B-501. Strains N1, N2, N3.1 and N3.2 were isolated from Natto produced by «Azuma Food» Utsunomiya, «Kajinoya», Kawasaki and «TOHO», Kobe (Japan), respectively.

The analysis of BOX-PCR and REP-PCR fingerprint profiles revealed differences between type strain and strains isolated from Natto. In strains N1, N2, N3.1 and N3.2 but not in type strain VKM B-501 the REP-PCR generated fragments in size of 200 bp and BOX-PCR generated fragments in size of 700 bp were observed. At the same time, only in strain VKM B-501 the BOX-PCR generated fragments in size of 300 bp and about 900-1031 bp and the REP-PCR generated fragments of 800 bp and in the range from 1200 to 1500 bp were amplified. No distinctions were found between BOX-PCR and REP-PCR generated fingerprint profiles of strains isolated from Natto.

Analyzing and comparing MALDI mass spectrometry data on the strains investigated we revealed some differences. In mass spectra of type strain VKM B-501, the peaks ( $m/z$  3239, 4355, 4695, 5094, 5705, 5715, 5781, 6125, 6459, 12245) that were not present in strains from Natto, were observed. At the same time in mass spectra of three strains from Natto (N2, N3.1 and N3.2) peaks that distinguished these strains from each other and from type strain were recorded:  $m/z$  5372 и 7125 in strains N2 and N3.1, respectively and seven peaks ( $m/z$  3201, 4760, 5722, 5955, 8029, 8362, 9576) in strain N3.2. Strain N1 has no distinctive individual peaks.

Identification of strain N1 based on analysis of the fragments of genes *gyrB* and *gyrA* showed that this strain is *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, the degree of similarity to type strain (NCIB 3610(T)) is 98,8% and 99,1 %, respectively.

#### **A034 EFFECT OF REBAMIPIDE ON INDOMETHACIN-INDUCED SMALL INTESTINAL INJURY – PHYSIOLOGICAL ROLE OF INTESTINAL MICROBIOTA**

S. Kurata<sup>1</sup>, T. Osaki<sup>1</sup>, T. Nakashima<sup>2</sup>, N. Uematsu<sup>2</sup>, M. Shibamori<sup>2</sup>, K. Sakurai<sup>2</sup>, S. Kamiya<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Infectious Diseases, Kyorin University School of Medicine, 6-20-2 Shinkawa, Mitaka, Tokyo 181-8611, Japan

<sup>2</sup> Third Institute of New Drug Discovery, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokushima, 771-0192, Japan

To clarify the role of microbiota in the mucosal injury, small intestinal ulcer model in rat caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) administration was examined microbiologically. Rebamipide was also administrated as the protective agent to ulcer model.

Indomethacin administration (10 mg/kg, p.o.) induced intestinal mucosal injury accompanied with an increase the numbers of intestinal bacteria particularly Enterobacteriaceae in jejunum and ileum. as the results of culture method and quantitative real-time PCR.

Rebamipide (30 and 100 mg/kg, p.o., 5 times) was shown to inhibit the indomethacin-induced injury and decreased the number of Enterococcaceae and Enterobacteriaceae in jejunum mucosa to the level of normal rats. It was also shown that the detection rate of segmented filamentous bacteria (SFB) was increased by rebamipide.

In conclusion, our study confirmed that disturbance of intestinal microbiota plays role on indomethacin-induced small intestinal mucosal injury, and suggest that rebamipide could be used for preventive therapy for NSAIDs-induced gastrointestinal mucosal injury, probably by modulating microbiota and suppressing mucosal inflammation in a small intestine.

#### **A035 ANTIMYCOTICS — REGULATORS OF HUMAN BIOTOPE EUKARYOTIC MICROBIOCENOSSES**

V. Lakhtin, A. Bajrakova, M. Lakhtin, S. Afanasiev, V. Aleshkin

G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology & Microbiology, Moscow, Russia

Antibiotic resistance of biotope relatively pathogenic microbiocenoses complicates therapy. Analysis of the system (genus, species) antibiotic dependence is important for evaluation of microbiocenoses status. The aim is to investigate system relationships between antimycotic panel and *Candida* pool of urban population urogenital biotope (UPUB) to control biotope status and predict population risk of diseases.

**Material and methods.** Standard conditions of growth of freshly isolated 22 clinical strains of *C. albicans*, *C. krusei* or *C. tropicalis* on Sabouraud agar in the presence of standard disc-antimycotics (Amphotericin B [A], Clotrimazole [C], Fluconazol [F], Itraconazol [I], Ketoconazol [K], and Nystatin [N]) were used. Antimycotic sensitivities were measured as diameters in «mm» of non-grown zones (zone arithmetic average of at least three figures was calculated).

**Results.** *Candida* pool of strains from UPUB was characterized by decreasing sensitivity to each type of antimycotics (the number of antimycotic-resistant strains tested is in brackets): N > K(1) > C(3) > F(4) > I(6) > A(12). Amphotericin revealed properties of universal marker of genus *Candida* resistance, and Nystatin revealed properties of universal suppressor of *Candida*. Sensitivity of *Candida* species to Clotrimazole decreased as *C. albicans* > *C. krusei* > *C. tropicalis*. Clotrimazole revealed properties of intragenus interspecies mode switcher within functional group *C. albicans* + *C. tropicalis*. Ranging antimycotic sensitivities were decreased in sets for: *C. albicans* (8 strains) as K(21.4) >> C(16.9) > F(16), N(16) >> I(12.0) >> A(6.5), *C. krusei* (6 strains) as N(18.0) >> K(14.3) > F(12.0), C(11.7) >> I(2.0) >> A(0), and *C. tropicalis* (8 strains) as K(23.8) >> N(19.0) >> F(14.3) > I(12.8) > A(11.3) > C(10.0). Identical sequence K > F > I > A for *Candida* intragenus species pool of UPUB was revealed. Nystatin and Clotrimazole revealed properties of leader variable members.

**Conclusion.** Results demonstrate effectiveness of system ranging analysis in revealing new aspects and roles of leader/regulator/signal antibiotics which are able to change taxonomic (species) relationships and composition of UPUB microbiocenoses in predicted manner.

#### **A036 LACTOBACILLUS SPECIES POOL SUPPRESSES ANTIMYCOTICS-RESISTANT CANDIDA SPECIES POOL FROM THE SAME BIOTOPE**

V. Lakhtin, A. Bajrakova, M. Lakhtin, S. Afanasiev, V. Aleshkin

G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology & Microbiology, Moscow, Russia

Increased resistance of biotope microbiocenoses against initiation and prolongation of diseases as well as for supporting healthy balance (in normal conditions of different ages, during antibiotic therapy, before and post surgery procedures, etc.) is extremely important for pro-

phylaxis, successful therapy and rehabilitation. Producers of spectra of antimicrobials as synergistic additives to antibiotics are of increased scientific interest. The aim was to screen, make strain's choice and evaluate of the *Lactobacillus* genus pool potential against *Candida* genus pool within urban population urogenital biotope (UPUB).

**Materials and methods:** Isolated and identified clinical strains of 22 mainly antibiotic-resistant strains of *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*) and selected strains of *L. acidophilus* (106, 124, 183a); *L. casei* (124b, 183) and *L. brevis* (104, 109, 143) isolated from UPUB were mixed as *Candida-Lactobacillus* pairs and grown in MRS in micropanels for 2 days at 37°C. Biofilms were stained with violet dye which was extracted and measured.

**Results: 1.** Three groups of *Lactobacillus* strains suppressed (in brackets) biofilm forming by *Candida* antibiotic-resistant strains: I (75–100%): 183, 143; II (25–75%): 183a, 109, 106, 104; III (0–25%): 124b, 124. **2.** *Lactobacillus* genus pool of strains from UPUB was characterized by the following orders of decreasing relative capability to participate in biofilms: a) without *Candida*: 183 > 143 > 183a > 106, 109 > 104 > 124b > 124; b) in the presence of *Candida* (calculative influence of the whole *Candida* pool on each *Lactobacillus* strain): 124b > 124 > 183 > 143 > 183a > 106 > 109 > 104. Both sequences possessed identical and variable (underlined) parts. Behavior of strains 124 and 124b looked like leader strains which revealed features of cross-talk communicative signal acceptors (*Candida* pools as early initiators).

**Conclusion.** Approach proposed demonstrates the possibility of evaluation of anti-*Candida Lactobacillus* genus or species pools potential. As key important part, approach allows detection of *L. acidophilus* and *L. casei* regulatory probiotic — like strains which may suppress *Candida* genus pools in UPUB.

### A037 COUPLED POOLS OF LACTOBACILLUS AND CANDIDA OF THE SAME BIOTOPE

M.V. Lakhtin<sup>1</sup>, V.M. Lakhtin<sup>1</sup>, S.S. Afanasiev<sup>1</sup>, A.V. Karaulov<sup>2</sup>, A.L. Bajrakova<sup>1</sup>, M.S. Afanasiev<sup>2</sup>, V.A. Aleshkin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology & Microbiology, Moscow, Russia

<sup>2</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Interspecies interactions are important for colonization resistance. The urogenital system *Lactobacillus* – *Candida* is sensor in process of biofilm formation (BF). The growths of *Candida* and *Lactobacillus* microbes result in BF depending on strains, species and their combinations. The aim is to review our results on study of coupled metabolic pools of biotope *Lactobacillus* and *Candida* strains.

**Materials and methods.** Urogenital *Lactobacillus* pool (8 strains of *L. acidophilus*, *L. brevis* and *L. casei*) and *Candida* pool (22 strains) of *C. albicans*, *C. krusei* and *C. tropicalis* were studied. The own methodology of comparative ranging growth and BF in mixed cultures was used. Microbial suspensions in MRS in optimized combinations were incubated 2 days at 37°C in microplates. Biofilms were stained with violet dye and the dye extract was measured in visible region. The ordering strains in sets of BF were evaluated by the appearance and distribution of (sub)species blocks.

**Results.** The (sub)species depended relationships between *Lactobacillus* and *Candida* were found and calculated. Pools of 2–3 *Lactobacillus* species influenced (sub) species ordering *Candida* strains BF and allowed calculation of 2 subspecies populations (as microecosystems) of *C. albi-*

*cans* or *C. tropicalis* in sets. The absence of leader *L. acidophilus* 124 or *L. casei* 124b (strains of type III) in *Lactobacillus* pool increased (sub)species population ordering *C. albicans* and *C. tropicalis* strains in opposite competitive manner.

**Conclusions.** The strains 124 and 124b may be used as the local BF sets disturbance strains, regulators and modulators of inter(sub)species relationships, biotope diagnostic and prognostic markers of dynamic (in)stability, probiotic like agents as well as instruments for constructing antagonistic and synergistic biotope pro- and eukaryotic microbiocenoses systems. New prospects of: Microbiota composition and functions at different human biotopes, Microbiota BF in colonization resistance, QS of *Lactobacillus* populations in eukaryotic BF and functions, Novel (poly)peptides-containing antimicrobials produced by *Lactobacillus*, Application of microecological approaches in clinic, Application of symbiotic microbiota in biotechnology, Screening new pro/pre/synbiotics, Basic general and individual completion and strengthening of biotope healthy balance, Modeling and constructing biocompatible and biodegradable mixed cellular live controlled systems can be developed.

### A038 INTESTINAL ALKALINE PHOSPHATASE: A MAJOR ROLE IN CONTROLLING GUT MICROBIOTA COMPOSITION, INFLAMMATION AND BODY HOMEOSTASIS

J.-P. Lallès

INRA - ADNC, Saint-Gilles, France.

Intestinal alkaline phosphatase (IAP) is predominantly expressed in the small intestine. It displays diverse homeostatic functions, including regulation of enterocyte surface pH, fatty acid absorption, detoxification (by dephosphorylation) of free nucleotides and bacterial lipopolysaccharide, down-regulation of NFκB signaling and subsequent reduction of (local and systemic) inflammation (1,2). IAP directly participates in intestinal inflammation resolution through resolvin-E1. IAP partially resists digestion and degradation in the small and large intestines, thus contributing to control inflammation also in the colon. Conversely, AP activity is normally low in healthy colon. Increased colonic AP activity often reflects increased inflammation, due to tissue infiltration by neutrophils that express nonspecific AP isoform. Recent data indicate that IAP shapes the gut microbiota indirectly by dephosphorylating luminal adenosine triphosphate (ATP) and other inflammatory nucleotide triphosphates (3,4). Endogenous IAP favours bacterial growth but is able to downregulate IL-8 production induced by Gram-negative bacteria (*E. coli*; *S. enterolytica*, Typhymurium) but not by Gram-positive bacteria. Conversely, ATP specifically inhibits the growth of Gram-positive bacteria. Importantly, luminal ATP directs lamina propria differentiation of inflammatory Th17 lymphocytes. Th17 cells secrete IL-17 and IL-22, cytokines that act on neutrophil recruitment and production of antibacterial peptides, thus contributing to shape the microbiota. Exogenous IAP reduces inflammation in various animal models (colitis, peritonitis, sepsis) and in humans (ulcerative colitis, coronary surgery and sepsis-induced renal failure), showing its strong anti-inflammatory power. IAP can prevent and reverse diet-induced metabolic syndrome in mice (5). Finally, stimulation of IAP expression and activity by the diet might be a valuable option for keeping a healthy microbiota composition.

### A039 INTESTINAL REGIONAL MODULATION OF ENZYME ACTIVITY PROFILES IN GERM-FREE PIGLETS AFTER NEONATAL ORAL ADMINISTRATION OF *LACTOBACILLUS AMYLOVORUS*

J.-P. Lallès<sup>1</sup>, A. Splichalová<sup>2</sup>, M. Bailey<sup>3</sup>, H. Smidt<sup>4</sup>, I. Splichal<sup>2</sup>

<sup>1</sup>INRA-ADNC, Saint-Gilles, France

<sup>2</sup>Institute of Microbiology, Novy Hradek, Czech Republic

<sup>3</sup>Veterinary School, Langford, University of Bristol, Bristol, UK

<sup>4</sup>Wageningen University, Wageningen, the Netherlands

*Lactobacillus amylovorus* was shown to reduce ileal pathogenic *Escherichia coli* concentrations and to promote body growth in infected weanling piglets (1). However, whether this probiotic modulates intestinal enzymes in pigs after birth is unknown. Importantly, intestinal alkaline phosphatase (IAP) detoxifies bacterial lipopolysaccharides, thus down-regulating inflammation (2). For investigating this, *L. amylovorus* (*L.am*: 2-3.10<sup>8</sup> CFU/animal) were administered (or not, controls) to germ-free piglets aged 1 or 7 days (n=4-7 per group). All piglets were slaughtered 7 days later and jejunal and ileal tissues were collected. Another group of 7d germ-free piglets given *L. amylovorus* for 7 days was infected with pathogenic *Escherichia coli* O55 the last day and killed 1 day later. Tissue activities of IAP, aminopeptidase N (APN) and sucrase were determined using specific substrates. Data were compared using nonparametric tests. Seven days after *L. amylovorus* administration to 1d-old germ-free piglets, IAP activity was much lower in jejunal and ileal tissues of *L. am* piglets than germ-free controls ( $P < 0.01$ ). Ileal APN was also lower ( $P < 0.01$ ) while ileal sucrase tended ( $P = 0.06$ ) to be higher. Jejunal APN and sucrase were unaffected. Similar changes were observed when *L. amylovorus* was administered to 7d germ-free pigs. *E. coli* administration further reduced ileal IAP and APN ( $P < 0.05$ ). Taken together, our findings are in line with those reported for IAP and sucrase following administration of non-pathogenic or pathogenic *E. coli* strains to germ-free piglets (3). In conclusion, *L. amylovorus* has the capability to stimulate enterocyte differentiation and to down-regulate IAP and aminopeptidase N activities in pig neonates. Our study also reveals important regional modulation of intestinal enzyme activities by *L. amylovorus*.

### A040 THE STUDY OF INTERACTION EFFECT BETWEEN GENES ASSOCIATED TO DRUG RESISTANCE IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX

R. Ludanny<sup>1</sup>, Alvarez-Figueroa M.<sup>1</sup>, A. Prokopenko<sup>1</sup>, L. Domotenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute for Epidemiology» of Federal Service on Consumers' Rights protection and human Well-Being Surveillance, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Federal State Institution of Science State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology, Obolensk, Moscow region, Russia

The key role of *M. tuberculosis* complex (MTBC) resistance formation belongs to SNPs in genes: *pncA* (Pyrazinamide, Z), *inhA*, *katG*, *oxyR-ahpC* (Isoniazide, H), *rpoCAB* operon (Rifampicin, R), *embCAB* operon (Ethambutol, E), as well as cluster of rDNA *rrs*, *rpsL* and *gidB*, *tlyA*, *eis* (Streptomycin, S). The distribution and genetic frequencies of mutations strongly depend on origin and geographic localization of isolates. Although, the harboring genetic processes (e.g. epistatic or complement interaction) might be affecting phenotype.

The molecular genetics techniques and bioinformatical analysis were applied for detailed investigation in genes

associated with resistance (*inhA*, *katG*, *oxyR-ahpC*, *ndh*, *rpoB*, *pncA*, *embB*, *rrs*, *rpsL*, *tlyA*, *gidB* and *eis*-promoter) from collection of 155 clinical phenotypic characterized MTBC isolates from Moscow region (Russia).

More over 5000 sequences have been revealed of 108 different SNPs in 13 genes, associated with loss of susceptibility in MTBC, except *oxyR*, *ahpC*, *tlyA* genes and *eis*-promoter, where the mutations were not found. The significances of genetic variability ( $Nm = 0.75\% - 27.7\%$ ) and genetic diversity ( $h = 3.7\% - 73.1\%$ ) showed absolute heterogeneity and were not correlated between themselves, that may indicate on spontaneous character of mutagenesis. The concordance score between phenotypic and genetic data were varied from 89 to 100% for all drugs without E (CS = 43.2%). By the principal component analysis all genes were classified into four groups: *katG*, *rpoB* and *pncA* separately and other genes were united in distant group that correlated with comparability of genetic changes, especially in XDR strains. Separately, the cross-resistance effect to S and aminoglycosides has been studied by decision graph method, where the combinatorial patterns of genetic changes were observed. The interactions between genomic replacements were reconstructed and visualized by Circos plot. The three general combinations of *embB-rpoB-pncA* (35%), *embB-rpsL-rpoB* (37%) and *embB-rrs-rpoB* (24%) were detected, where the central role of interaction has been belonged to *embB* gene. It's suggested that it might be closely related to formation of barrier function in mycobacterial cell and the origin of SNPs in *embB* is action of other drugs (H, R, Z and S). This appeared as complement interaction and may not be related to ethambutol resistance.

### A041 CHROMOSOMAL ISLANDS OF *STREPTOCOCCUS PYOGENES* AND RELATED *STREPTOCOCCI*: MOLECULAR SWITCHES FOR SURVIVAL AND VIRULENCE

W.M. McShan

Department of Pharmaceutical Sciences, The University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, OK, USA

*Streptococcus pyogenes* is a significant bacterial pathogen of humans, globally causing over 700,000,000 infections and 500,000 deaths annually. Virulence in *S. pyogenes* is closely linked to mobile genetic elements like phages and chromosomal islands (CI). Our laboratory has characterized *S. pyogenes* phage-like chromosomal islands (SpyCI) that confer a complex mutator phenotype on their host. The SpyCI integrate into the 5' end of DNA mismatch repair (MMR) gene *mutL*, which also disrupts downstream operon genes *lmrP* (multidrug efflux), *ruvA* (Holliday-junction helicase), and *tag* (base excision repair). The SpyCI excises from the bacterial chromosome during early logarithmic growth phase and replicates as an episome, relieving the mutator phenotype. As growth slows and the cells enter stationary phase, the SpyCI then reintegrates into the chromosome and again silences the MMR operon. This system creates a unique growth-dependent and reversible mutator phenotype. Although originally discovered in *S. pyogenes*, CI integrated into the identical attachment site in *mutL* have now been identified in related species, including *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus parauberis*, and *Streptococcus canis*. These CI have small genomes, which range from 13-20 kB, and have no identifiable gene encoding capsid proteins. Preliminary studies suggest that the SpyCI employ a helper phage for packaging and dissemination in a

fashion similar to the *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands (SaPI). A group of core genes is always present in these CI, with the conserved site-specific integrase and DNA replication genes being prominent. Outside of this core gene group, the CI that target the MMR operon show considerable diversity with the presence of many indels that may contribute to the host cell phenotype or fitness. The SpyCI are a subset of a larger family of streptococcal CI that potentially regulate the expression of additional host genes controlling other DNA repair or metabolic pathways. The biological and phylogenetic analysis of the SpyCI and the related chromosomal islands from other streptococci provides important clues as to how these chromosomal islands help *S. pyogenes* and other streptococcal species persist in human populations in spite of antibiotic therapy and immune challenges.

This work was made possible by an Oklahoma Center for the Advancement of Science and Technology (OCAS) grant HR11-133 and by NIH Grant Number R15A1072718 to WMM.

#### **A042 IS AN IDEA OF BIOFILM PROBIOTICS GOOD OR BAD?**

V. Melnikov<sup>1</sup>, V. Khlebnikov<sup>2</sup>, I. Kosarev<sup>2</sup>, V. Sakulin<sup>2</sup>, R. Vasilenko<sup>2</sup>, A. Mescheryakova<sup>2</sup>, N. Kulikova<sup>2</sup>, V. Chistyakov<sup>3</sup>, N. Ushakova<sup>4</sup>, N. Kiryukhina<sup>5</sup>, V. Ilyin<sup>5</sup>, M. Chikindas<sup>6</sup>, A. Karlyshev<sup>7</sup>, B. Kuznetsov<sup>8</sup>, D. Gruzdev<sup>8</sup>, E. Kudryashova<sup>9</sup>, N. Suzina<sup>9</sup>, V. Abramov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>International Science and Technology Center, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Institute of Immunological Engineering, Lyubuchany, Moscow region, Russia

<sup>3</sup>The Southern Federal University, Rostov-na-Donu, Russia

<sup>4</sup>A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Moscow, Russia

<sup>5</sup>Institute of Biomedical Problems RAS, Moscow, Russia

<sup>6</sup>Rutgers State University, New Brunswick, NJ, USA

<sup>7</sup>Kingston University, London, United Kingdom

<sup>8</sup>Centre Bioengineering RAS, Moscow, Russia

<sup>9</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Puschino, Moscow region, Russia

Biofilm is a stress-tolerant community of microorganisms held together by intercellular junctions and a self-produced extracellular matrix. It forms on the surface of objects of the environment and the tissues of living organisms. In the view of some authors, the biofilm is a multicellular organism with its inherent development cycle, cooperative behavior of its individuals coordinated by system of quorum sensing. Biofilm is a dominant lifestyle of bacteria in the natural environment. The «natural» way of bacterial existence is actively investigated. Mainly, the biofilms of pathogenic bacteria are studied in order to learn how to effectively combat chronic infectious pathology. But not only pathogenic bacteria form biofilms. Beneficial resident bacterial flora of the human body also grows in a biofilm. On the market there is a large number of probiotics, which contain live beneficial microorganisms intended for the restoration of violated intestinal biocenosis. All the current probiotics are planktonic microorganisms obtained by laboratory cultivation on nutrient media. However, bacteria living in nature are greatly different by the properties from the cultures grown in «classic» laboratory conditions. So we proposed that biofilm probiotics had advantage over the marketed ones. One can suggest that biofilm-driven gene expression might make the probiotics bacteria harmful for the human health. There are several defenses to this counterclaim. First, the normal human and animal microbiota grows in a biofilm. Second, according to our study the traditional Japanese health-giving foods Natto

(soya beans fermented by *Bacillus subtilis*), which Japanese people consume for hundreds of years, represent fermenting bacteria in a biofilm. Third, Williams and Costerton (2011) demonstrated that the *S. aureus* biofilm is much less virulent than its planktonic laboratory culture. Forth, our experiments on animals (mice, rats, dogs, poultry, aquaculture fish, etc.) and human volunteers show that the biofilm bacteria are not only harmless but health beneficial. So the results of our studies indicate the possibility of biofilm application for the development of new generation of medical and veterinary probiotic preparations and products of functional nutrition.

#### **A043 IMPACT OF A PROBIOTIC STRAIN LACTOBACILLUS FERMENTUM ME-3 ON LIPID PROFILE OF BLOOD IN HEALTHY ADULTS**

M. Mikelsaar<sup>1</sup>, K. Zilmer<sup>2</sup>, T. Kullisaar<sup>2</sup>, M. Zilmer<sup>2</sup>, P. Hütt<sup>1</sup>, J. Stsepetova<sup>1</sup>, E. Sepp<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dept. Microbiology

<sup>2</sup> Dept. Biochemistry University of Tartu, Estonia

A large list of investigations has shown that the impact of probiotics on metabolism markers of host can be quite specific (Mikelsaar&Zilmer, 2009; Rabot et al 2010; Sharafedtinov et al, 2013). A meta analysis of 13 probiotic studies indicate that a diet rich in probiotics decreases total cholesterol and low density cholesterol concentration in plasma for participants with high, borderline high and normal cholesterol levels (Guo *et al.*, 2011). The aim of this report was to evaluate the effect of the probiotic *Lactobacillus fermentum* ME-3 on some health biomarkers associated with maintenance of cardiovascular health in adult volunteers.

**Material and methods.** *Lactobacillus fermentum* ME-3 was previously isolated from the gastrointestinal tract of healthy Estonian children and the functional properties determined [Mikelsaar *et al* 2002; Songisepp *et al.*, 2006]. The probiotic kefir containing *L. fermentum* ME-(4 x 10<sup>7</sup> cfu/ml) was developed at AS TERE in Estonia. The randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-designed, two-armed intervention study was performed and conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki 1996-2000. The study was approved by the Ethics Committee of University of Tartu. Inclusion criteria were: a desire to participate, appropriate age (35-65 years), elevated blood lipids (high borderline levels of blood total cholesterol/cholesterol fractions: ≥3.4 mmol/l for LDL-cholesterol, ≥3.0 mmol/l for the LDL/HDL-cholesterol ratio, ≥5.2 mmol/l for the total cholesterol and ≥1.7 mmol/l for the level of triglycerides), no use of any concomitant treatment. The eligible volunteers (n=137) were randomly divided into treatment (n=71) and control (n=66) groups. Altogether, the trial lasted for 8 weeks. For the treatment group, 200 ml/day of probiotic product (kefir) containing *L. fermentum* ME-3 was consumed in amount of 8 x 10<sup>9</sup>cfu. Members of the control group consumed the same amount of a probiotic-free kefir. The primary markers for the cardiovascular health state were plasma total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL), triglycerides (EFSA Journal, 2011, 9). The analyses were performed with standard laboratory methods using certified assays in the clinical laboratory of the University Hospital of Tartu.

**Results.** The weight and BMI did not change after 8 weeks of probiotic consumption. The significant extent of changes between consumption of probiotic and control kefir was detected in reduction of total cholesterol (p=0.019), LDL (p=0.037), LDL/ HDL ratio (p=0.004), triglycerides (p=0.044), oxidated LDL (p=0.0002), urine prostaglandines (p=0.0001) levels and in the increase of adiponectin (p=0.003)



level. Fecal ME-3 copy numbers were assessed and correlated with the extent of change in values of blood indices after probiotic consumption as compared to baseline ones.

Conclusion: Probiotic *L. fermentum* ME-3 helps to improve the borderline high blood indices of lipid metabolism thus maintaining cardiovascular health in otherwise healthy persons.

#### A044 PHAGE TREATMENT OF HUMAN INFECTIONS

N. Mutlu, P. Aksu, A. Dogan, S. Otlu

*Kafkas University, Faculty of arts and science, Department of Biology, Kars, Turkey*

Bacteriophage therapy is an important alternative to antibiotics in the current era of multidrug resistant pathogens. We reviewed the studies that dealt with the therapeutic use of phages in the last years. Western physicians abandoned phage medicine when penicillin and other chemical antibiotics were discovered starting in the 1940s whereas the former Soviet Union kept developing phage preparations. The Republic of Georgia, some Eastern European countries and the United States have been developing phage isolates and preparations.

#### A045 ISOLATION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* BACTERIOPHAGES FROM ENVIRONMENTAL SOURCES IN KARS (TURKEY)

N. Mutlu, M. Şahin

*Kafkas University, Faculty of arts and science, Department of Biology, Kars, Turkey*

Bacteriophages are ubiquitous in our world — in the oceans, soil, deep sea vents, the water we drink, and the food we eat. In this study we collected 50 environmental samples in the Region of Kars (North-East Turkey). Upon arrival, samples were cleared by filtration and provided with a virulent phage stock and a susceptible host cell culture (*Listeria monocytogenes* ATCC 7644). 10-fold dilutions of the phage stock are prepared. 5 µl of phage dilutions plated on freshly plated bacterial lawn and leave overnight at 30°C for 12-18 hours. After overnight incubation, plates were checked for lysis. 13 of samples made lysis on *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

#### A046 THE COMMENSAL BACTERIA AND SHORT CHAIN FATTY ACIDS AFFECT TO IMMUNOGLOBULIN A PRODUCTION BY THE IMMUNE CELLS DERIVED FROM THE GUT ASSOCIATED LYMPHOID TISSUES IN SMALL AND LARGE INTESTINES

K. Nakata<sup>1</sup>, T.-Z. Yu<sup>1</sup>, Y. Kutsukake<sup>1</sup>, M. Suzuki<sup>1</sup>, S. Hachimura<sup>2</sup>, K. Takahashi<sup>1</sup>, S. Kaminogawa<sup>1</sup>, A. Hosono<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Food and Physiological Functions Laboratory, Department of Food Bioscience and Biotechnology, Nihon University, Japan*

<sup>2</sup>*Research Center for Food Safety, Graduate School of Agricultural and Life Science, The University of Tokyo, Japan*

**Introduction.** Commensal bacteria inhabit the intestinal tract and modulate the host immune system in the body, as well as the digestion and absorption of nutrients. Furthermore, it is known that huge numbers of the intestinal microbiota produce the microbial metabolites, short-chain fatty acids (SCFAs) and maintain the intestinal environment in the host. Therefore, it is important to reveal the influence of commensal bacteria on intestinal immune system and the mechanism underlying the symbiotic relationship. The purpose of this study is to compare the immune responses of gut associated lymphoid tissue (GALT) in small and large intestines, which has different enteric environment. We especially focused on

the immunomodulation of SCFAs to immunoglobulin A (IgA) production by the lymphocytes from GALT.

**Materials and methods.** In order to determine how intestinal commensal bacteria and SCFAs induce the different immunomodulatory effects on IgA production, we examined differences in IgA production by murine intestinal lymphocytes from Peyer's patches (PPs) in the small intestine, cecal patches (CePs) and colonic patches (CoPs) in the large intestine induced by the predominant murine intestinal microorganisms, *Bacteroides* and *Lactobacillus*. We co-cultured murine PP, CeP or CoP cells with *Lactobacillus johnsonii* 129, *Bacteroides acidifaciens* type A43, and stimulated with lactic acid (LA), acetic acid (AA), butyric acid (BA), or propionic acid (PA) for 7 days, and IgA concentration in the supernatant was measured by ELISA.

**Results.** It was observed that the bacterial stimulation of *Bacteroides* induced higher IgA production of CeP, CoP cells than that of PP cells. SCFAs stimulation showed different pattern of immunomodulatory effects. The stimulation of LA or AA (0.1-10 mM) maintained higher level of IgA production, although high dose of BA or PA decreased IgA production.

**Conclusion.** It suggest that commensal bacteria and their metabolites might affect the IgA production of the lymphocytes from GALT, and the reactivity to SCFAs might be different among PP, CeP, and CoP cells.

#### A047 FAECAL MICROBIOTA TRANSPLANT AGAINST *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* ASSOCIATED INFECTION

E. Norin

*Department of Microbiology Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden*

Treatment with the antibiotics as e.g. clindamycin and cephalosporins has been a major cause of occurrence of antibiotic associated diarrhoea (AAD). In addition, since 2000, treatment with fluoroquinolones has also frequently resulted in AAD, particularly in Canada and US.

Antibiotic treatment with metronidazol or vancomycin is most often used with good results to cure the *Clostridium difficile* associated infection (CDAI). In patients with relapses, the use of these antibiotics to cure the disease has been less favorable, even if a tapering scheme with vancomycin quite often results in improvement. However, in as much as 30% of the CDAI patients, relapses without another course of antibiotics have been reported. Alternative treatment strategies, such as the use of probiotics have been tested to cure CDAI, however, no significant effect has been proven.

Transplantation of faeces from a close relative has been discussed and sometimes practiced during the years as an alternative treatment in still relapsing patients (1, 2). Faecal microbiota transplantation (FMT) is nowadays becoming increasingly accepted as an effective and safe intervention in patients with recurrent disease, likely resulting in the restoration of a disrupted intestinal microbiota ecology. The development of an anaerobe faecal culture for transplantation has been a time consuming process. The donor has to be screened with regard to health condition and the culture with regard to absence of pathogens and other disease causing organisms,

Within our group, we now have a strict anaerobe culture originating from one healthy adult donor who has been investigated for the absence of major viral and bacterial pathogens such as hepatitis virus A, B and C, Human cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, HIV, rotavirus, calicivirus, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia*

and *Clostridium difficile*. This culture has been recultivated on freeze-dried hen yolk medium containing cholesterol for years under strict controlled conditions.

Over the years, this anaerobe culture has been given as a 30 ml suspension by a rectal catheter without prior laxation or by nasogastric tube to many Norwegian and Swedish CDAD patients who have terminated their antibiotic treatment 1–3 days prior to transplantation. The cure rate is up to 90% (3, 4).

The administration of the culture follows a simple procedure, easy to perform, cheap and thus reduces repeated antibiotic treatments, which in turn diminishes the risk for antibiotic resistance development. Most important, it enables a rapid and retained cure of patients who have experienced two or more prior episodes of CDAI.

We are now starting a controlled larger study, where we aim to compare vancomycin treatment with this anaerobe culture treatment with regard to outcome and cost benefits.

#### **A048 DEVELOPMENT OF BIOTECHNOLOGY BIORESOURCES. BELARUSIAN COLLECTION OF NON-PATHOGENIC MICROORGANISMS**

**G.I. Novik<sup>1</sup>, E.I. Kolomiets<sup>1</sup>, S.P. Sineoky<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Microbiology, Belarus Academy of Sciences*

<sup>2</sup>*Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Russian National Collection of Industrial Microorganisms*

Sustained performance of large national service collections of microorganisms is the prerequisite for development of industrial biotechnology in EuroAsian Economic Community (EurAsEC) countries. National collections of EurAsEC member states were founded for implementation of vital infrastructural tasks in the area of bioreources, including provision of research and industrial institutions specializing in biotechnology with essential microbial cultures.

The number and spectrum of microorganisms subject for preservation ex situ to be further used in basic and applied investigations is steadily expanding. Expert forecasts evidence prevalence of this tendency for the forthcoming decades.

Meeting demands of researchers for type cultures is extremely significant for natural microbial diversity studies. The growing role of national biodepositories in standardizing strains-objects of biotechnology secures protection of intellectual property rights and biosafety of utilized microbial resources.

High-quality operation of national collections and proper maintenance of huge stock of cultures is grounded on solid scientific and methodological basis, i. e. application of up-to-date methods of microbial conservation, taxonomic and strain identification, processing massive volume of data on collection entries, analysis of various valuable characteristics of microorganisms, competence in aspects of intellectual property protection and safety of biotechnological processes engaging genetically modified microbial cultures.

Owing to rapid progress of genetic engineering and microbial genome sequencing, the volume and range of applied bioreources tend to rise in all advances economies. Tough competition trend is recorded at the global market of microbial resources and related services among the greatest world depositories relying on considerable state financial support. Now microbial resources attained strategic priority status requiring intensification of national collection cooperation which, in turn, is determined by integration extent of EurAsEC countries.

Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms functioning at the premises of Institute of Microbiology,

NAS Belarus is a central depository of reference, type and industrial microbial strains in Belarus republic. It is rated as the National asset.

Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms (formal acronym BIM, WDCM 909) is the only state institution of this kind in the republic registered by World Federation of Culture Collections incorporating 592 collections from 68 countries.

Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms is authorized to deposit microbial strains for subsequent patenting procedure.

Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms comprises the following sections: bacteria, bacteriophages, mycelial fungi, yeast-like fungi. The fund encompasses over 1500 microbial cultures representing different taxonomic groups, with more than 150 strains deposited for further national patent protection. Bank of valuable industrial microorganisms was set up on the basis of Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms. It also includes specialized collections of micromycetes – agents biodeteriorating construction materials and of phytopathogenic species. Strains deposited at Belarusian collection are used for production of proteins, enzymes, carotenoids and other bioactive substances, probiotics, biofertilizers, preparations for degradation of aromatic xenobiotics.

Deposited cultures are utilized in pilot plant production of biological control agents, bioactive supplements, fodder-ensiling formulas, preventive – therapeutic veterinary compositions. Belarusian collection carries out active editorial activity. Catalogue of microbial cultures, Catalogue of valuable industrial microorganisms, Database of Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms, Database of valuable industrial microorganisms comprising records of type, reference, industrial strains-producers affiliated to diverse taxonomic groups, the list and composition of nutrient fermentation media, referential literature were published.

Currently international cooperation of Russian and Belarusian collections is successfully extended. Special emphasis is focused on development of legislative basis underlying activities of national collections, perfection of mechanisms governing replenishment of deposited stock, promotion of collaboration and specialization between regional collection groups and in some cases initiation of closely interacting associations of biodepositories.

#### **A049 GINGIVAL TISSUE AS A VIABLE ROUTE TO INTRODUCE BIOMEDICAL COMPOUNDS FOR THE ELDERLY: A PRELIMINARY STUDY USING THE GREEN TEA CATECHIN COMPOUND**

**K. Ochiai**

*Department of Microbiology, Nihon University School of Dentistry,  
Tokyo 101-8310 JAPAN*

Aging results to immunosenescence whereby there is a decrease in immune response and, consequentially, an increase in infectious disease susceptibility. This would explain why the elderly population is always at risk during an infection. Gingival fibroblast cells decline relative to age suggesting that as we grow older the space between the tooth and gingival tissue becomes loose. One possible advantage of gingival fibroblast cell reduction is that this can serve as a viable route to effectively administer biomedical compounds to the elderly, however, this was never fully elucidated. Throughout this study we made use of representative young (10-wk old) and middle-aged (40-wk old) male rats while the compound used is a gel-encapsulated

catechin (GEC). One set was orally-applied with GEC everyday for 30 days while the other set was used as control. After the 30-day catechin application, heart blood was obtained and both blood mitochondria and cytosol were isolated for further analyses. We measured *O*-methyl derivatives in the blood serum to confirm entry of GEC into the blood stream via the gingival route. Heme amounts, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) levels were determined in the blood mitochondria while heme, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CAT, gp91<sup>phox</sup>, NADP and NAD pools, sirtuin 1 (SIRT1), glutathione reductase (GR) activities, and free fatty acids (FFA) levels were measured in the blood cytosol to establish the GEC systemic effects. We found that *O*-methyl derivatives were higher among the middle-aged rats as compared to young rats consistent with gingival fibroblast cell decline. Moreover, we established that catechin entry into the blood stream was able to significantly affect both the blood mitochondria and cytosol among the middle-aged rats. In the blood mitochondria, we found that orally-applied catechin increases mitochondrial heme levels which we speculate is associated with antioxidant activity, particularly CAT. In the blood cytosol, we established that GEC is associated to decreased heme-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> amounts while increasing heme-independent CAT activity. Moreover, we found that GEC decreased NAD<sup>+</sup> amounts among middle-aged rats and is associated to increased NADPH levels and SIRT1 activity, whereas, GEC decreased NAD<sup>+</sup> amounts among young rats is only correlated to increased SIRT1 activity which we associated to gingival fibroblast cell status. Furthermore, we observed that FFA and GR were increased among GEC-treated middle-aged rats presumably ascribable to OSC-induced increase in NADPH levels.

#### **A050 COMPARATIVE STUDY ON INFECTIVITY AND ADHESION AMONG *HELICOBACTER PYLORI* STRAINS ISOLATED FROM FAMILY MEMBERS**

T. Osaki, C. Zaman, F. Hojo, H. Yonezawa, S. Kurata, T. Hanawa, S. Kamiya

Department of Infectious Diseases, Kyorin University School of Medicine

*H. pylori* infection usually almost occurs under 2 years old in human life. The transmission route from family member to child is most frequent in Japan. We have used the several strains isolated from family members for animal experiment to compare the infectivity of the isolates to host.

*H. pylori* K21 or K22 strain was isolated from father or mother and K23-25 strains were isolated from three children of the family. Three different sequence type (ST) strains of *H. pylori* (K21:ST2760, K22:ST2761 and K25:ST2762) were used in this study. Mongolian gerbils were inoculated with *H. pylori* K21 or K22 strain at 1<sup>st</sup> inoculation and also inoculated with *H. pylori* K25 at 2<sup>nd</sup> inoculation 10 days after the 1<sup>st</sup> inoculation. An opposite inoculation order experiment was also done. Five weeks after the 2<sup>nd</sup> inoculation, gastric *H. pylori* were cultured from stomach of Mongolian gerbils. Bacterial DNA was extracted from each colony and analyzed by RAPD fingerprinting and direct-sequencing of *trpC*. The ability of adherence to gastric cell line (AGS) and growth of three strains were compared as *in vitro* study.

All colonies were determined as the same molecular type of K25 in 4 group animals. In these results, the

*H. pylori* K25 was dominant in the infection of Mongolian gerbil. The adhesion ability of *H. pylori* K25 strain was higher than that of other strains. These results showed that the enhanced adhesion activity might be one of the reasons of infection to children with the different type strain K25 from parental strain.

#### **A051 APPLICATION OF ILLUMINA SEQUENCING TO CHARACTERISE CRYPTOSPORIDIUM HUMAN CLINICAL ISOLATES, THE POTENTIAL FOR DIAGNOSTIC SEQUENCING AND GENO-EPIDEMIOLOGY**

J.A. Pachebat<sup>1</sup>, J.L. Alexander<sup>1</sup>, S.J. Hadfield<sup>2</sup>, G. Robinson<sup>2</sup>, S. Cameron<sup>1</sup>, M.J. Hegarty<sup>1</sup>, K. Elwin<sup>2</sup>, R.M. Chalmers<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences, Aberystwyth University, UK

<sup>2</sup>Cryptosporidium Reference Unit, Public Health Wales Microbiology, Singleton Hospital, Swansea, UK

Cryptosporidium is a parasitic protozoan that causes self-limiting but severe gastroenteritis in immuno-competent human hosts and possible prolonged morbidity and/ or mortality in immuno-compromised hosts. The study of Cryptosporidium is hampered by an insufficient understanding of species sub-types and diversity. Genome sequencing can give a wealth of information about infectivity, phylogeny, and host specificity, but to date only three species have been genome sequenced and published and these utilised oocysts propagated from experimentally infected animals.

There are significant challenges in the generation of genome sequence data from stools in a diagnostic setting: i) NGS methods require significant amounts of genomic DNA and stool samples received by diagnostic laboratories are limited in volume; ii) stools contain relatively small numbers of *Cryptosporidium* oocysts amongst very large amounts of non-target organisms, mainly bacteria, which is problematic for production of the purity of genomic DNA required for analysis; iii) there is a lack of a suitable culture system capable of producing sufficient yields of parasites.

We have developed a process to isolate, extract and sequence *Cryptosporidium* oocyst DNA directly from clinical samples. This method has been applied to characterise several clinical isolates, including the new human pathogen, *Cryptosporidium viatorum*. We discuss how this technique is being used to increase our knowledge of the biology, transmission, virulence and geno-epidemiology of various *Cryptosporidium* spp. that infect humans, and so improve diagnosis, control and treatment of cryptosporidiosis. We also discuss the further application of single cell genomics approaches to isolate, extract, amplify and NGS sequence oocyst DNA directly from clinical diagnostic samples.

#### **A052 CHARACTERIZATION OF HOST-RANGE MUTATIONS IN GENOMES OF STAPHYLOCOCCUS TWORTLIKEVIRUSES**

R. Pantucek<sup>1</sup>, M. Benesik<sup>1,2</sup>, M. Varga<sup>1</sup>, I. Maslanova<sup>1</sup>, M. Mosa<sup>2</sup>, J. Bostik<sup>2</sup>, J. Doskar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>MB PHARMA s.r.o., Praha, Czech Republic

The emergence and alarming increase of multiresistant strains of *Staphylococcus aureus* emphasizes the need for new and innovative antimicrobial strategies. Polyvalent bacteriophages from the family *Myoviridae*, sub-family *Spounavirinae* of genus Twort-like phages that infect

*S. aureus* have potential for use in phage therapy. In this study we characterized genomic sequences of the polyvalent staphylococcal phage 812 and its spontaneous host-range mutants selected on non-susceptible *S. aureus* strains. The wild type phage was shown to lyse up to 65%, whereas host-range mutants up to 95% of *S. aureus* strains under study.

Genomic DNAs of five phages were sequenced using 454 Genome Sequencer Junior (Roche). Bacteriophage DNA sequences were assembled by software GS De novo Assembler and GS Reference Mapper (Roche). Genome of phage K was chosen as the reference.

Detailed analysis of obtained sequence data showed that the phage genome consists of linear double-stranded DNA without cohesive ends, with 35-bp tandem terminal repeat and repeat count 5. Genome size of the wild type phage is 142,096 bp and molar GC content was 30.42%. In the genome, 220 putative genes were identified, out of which for 148 genes their function can be predicted. Three genes for tRNA were found. Neither toxins nor superantigens nor genes for lysogenic phage cycle were detected which confirms suitability of the bacteriophage for clinical purposes. The sequences of the host-range mutants involve SNPs, short (5 bp or 9 bp) substitutions and long deletions. The major deletions concern 2,012-bp deletion associated with rearrangement of tail tube gene sequence, 456-bp deletion in gene for hypothetical structural protein, 77-bp deletion in putative tail appendices gene, 33-bp deletion in DNA ligase gene, 46-bp deletion in DNA primase gene, and 1,509-bp deletion in the endolysin gene.

The possible defense mechanisms of the strains which can result in their insensitivity to phages are unknown. Different phage resistance mechanisms such as phage adsorption, *SauI* restriction-modification system, presence of specific prophage types and CRISPRs were examined. No correlation with the host-range mutations and characteristics of non-susceptible host strains was found yet.

This work was supported by projects TA01010405 and CZ.1.07/2.4.00/31.0155.

### **A053 EFFECTS OF PROBIOTICS ON GROWTH OF SALMONELLA SPP. FROM THE SALMONELLA CARRIER-SHEEP IN ARMENIAN FARMS**

A. Pepoyan<sup>1,2</sup>, A.Y. Hamid<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Anau

<sup>2</sup>Iahahi

Probiotics, being important for the improvement of host's immunological status, could also be active against asymptomatic gut bacteria.

The *main aim* of this investigation is to evaluate the effects of probiotics: *Lactobacillus acidophilus* INMIA 9602 (Er-2 strain 317/402), M17 and ASAP on growth of *Salmonella* spp. from the sheep fecal microflora.

The study was conducted in the farms of Sevan, Gavar and Yerevan regions of Armenia. A total of 75 sheep (asymptomatic *Salmonella* carriers) and about 179 faecal *Salmonella* isolates from these animals were investigated.

The antimicrobial activities of probiotics were investigated and different activities of *Lactobacillus acidophilus* INMIA 9602 (Er-2 strain 317/402), M17 and ASAP against gut *Salmonella* isolates during the preliminary investigations were revealed.

*Salmonella* carriage of sheep is on the rise in Armenian farms, independent of geographical location and seasonal effects. The commercial probiotics can be suggested for the use in farms to reduce the risk of possible infections as well as to eliminate gut ecosystem from multi resistant unwanted bacteria.

### **A054 BACTERIOPHAGOTHERAPY OF THE URINARY TRACT INFECTION**

T.S. Perepanova

Scientific Research Institute of Urology Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

**Introduction.** Bacteriophages are the viruses parasitizing on bacterial cells. The antibacterial effect is caused specific lysis pathogenic bacteria in the inflammation site. As a part of each preparation of a bacteriophage of 8–10 clones of virulent races of the bacteriophages possessing high specificity, not having oppressing effect on normal enteric microflora. Possibility of adaptation of bacteriophages to antibiotikoresistant strains of bacteria increased in recent year's interest to them.

**Material and methods.** For increasing of efficiency phagotherapy urinary tract infections (UTI) we carried out adaptation of preparations of bacteriophage on phages factory to uropathogens from urological patients. As a result of adaptation the sensitivity of microorganisms to phages increase, especially notably when comparing a sensitivity of *E. coli* and *Proteus mirabilis* in 1993 и 1994 years — from 78,3% and 45,5% to 88% and 85% respectively increased. Therapy by bacteriophages began after detection of a sensitivity of uropathogens. To treatment applied liquid bacteriophages: *Pseudomonas*, *Proteus*, *E.coli*, *Staphylococci*, *Streptococci*; *Piobacteriophage combined*, *Coli-Proteus* and a phage of an *Enterobacter*. Bacteriophages applied both local, and per os. Duration of treatment of 7-10-20 days, depending on the diagnosis and results of the cultural analysis of urine.

**Results.** Efficiency of a phagotherapy was estimated on absence or considerable reduction of number of microorganisms in urine or in a wound, by normalization of body temperature, clinical analyses of urine and blood, to an objective condition of a wound, improvement of a clinical status of a disease. Control bacteriological analysis made in 3, 10, 20 days of treatment by phages, and also in 2-3 weeks after the course of therapy.

**Discussion.** Efficiency of treatment *E.coli*, *Proteus* spp, and staphylococcal UTI was 86-93%. At treatment of *P. aeruginosa* UTI the clinical-bacteriological effect was 81% of cases, an *Enterobacter agglomerans* — in 77% of cases.

**Conclusion.** Bacteriophagotherapy UTI is an independent antibacterial method of treatment and can be applied as a method of a selective decontamination. Efficiency of treatment by phages depends on their adaptation to bacteria. Possibility of adaptation gives of bacteriophages considerable advantages, in comparison with antibacterial chemotherapy.

### **A055 ROLE OF BIOFILMS IN GENESIS OF INFECTIOUS STONES OF KIDNEYS**

T.S. Perepanova<sup>1</sup>, L.V. Didenko<sup>2</sup>, Yu.M. Romanova<sup>2</sup>, E.R. Tolordava<sup>2</sup>, U.A. Radzhabov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>SR «Institute of Urology» Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Research institute of epidemiology and microbiology of N.F. Gamaleya Ministry of Health of Russia, Moscow

**Research objective:** To estimate value of biofilms in genesis of stones of kidneys

**Material and methods:** In total it is surveyed 177 stones received from patients during of surgical treatment. Applied the bacteriological methods, scanning electronic microscopy and the x-ray microanalysis.

**Results.** Microorganisms in stones at sterile urine were found in 57 of 138 cases, i.e. in 41,3%, and at a sterile

stone microorganisms in urine are found only in 7 cases from 88 – 8,0%. In urine *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *E. Coli* most often met. In stones – *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus haemolyticus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *E. Coli*. Cystins stones were sterile, by urats are infected in 21,4%, oxalats in 36,6%, phosphatics in 54,4% and struvits in 100% of cases. Biofilms were absent in those sites of stones where was a calcium. At electronic microscopy it is revealed that bacteria use tubulyar outgrowths of 60–90 nanometers in size for f contact with a substratum (a mucous membrane, a stone), bacteria and eukaryotic cells. Biofilm formation on mucous pelvis of a kidney can be the first stage of the beginning of formation so-called "an infectious stone". The further ureaza production microorganisms promotes subsidence on a surface of biofilms of the changed components of urine that gives growth to a stone and "cementation" of biofilms in a stone.

**Conclusions:** The found connective tissue on the distal surfaces of stones are important for an assessment of reaction of tissue of a kidney pelvis on biofilm and stone presence, and also for an explanation of possible mechanisms of development of stones of infectious genesis and stone recurrence after operative removal of stones. Preservation of solderings with stones splinters after a lithotripsy is one of the significant reasons of recurrence nephrolitiasis. Thus, it is shown that microorganisms are capable to play a key role in nephrolitiasis, being the crystallization centers. Detection of microorganisms from a stone is much higher, than from urine.

#### A056 CONSUMPTION OF FUCOSYLLACTOSE BY INFANT BORNE BIFIDOBACTERIA

M. Popovic

Department of Food Science and Technology  
Department of Viticulture and Enology  
University of California

**Introduction.** Human milk and its assembled glycome is known to enrich specific bifidobacterial populations in the infant gastrointestinal tract. Inactive alleles of the fucosyltransferase 2 gene (FUT2; termed «secretor» due to its role in the expression of ABO blood types in secretions) are common in many populations. Some bifidobacteria (common infant gut commensals) are known to be able to consume 2' fucosylated glycans, such as the oligosaccharides found in the breast milk of a secretor (FUT2+) mother. This work aimed to test whether there is a difference in the ability of bifidobacterial isolates from both secretor-fed infants and non-secretor-fed infants to grow on 2'-fucosyllactose (2FL) as sole carbon source. We also compared the representation of bifidobacterial species isolated from feces to that of data obtained using a Bifidobacterial-specific terminal restriction fragment length polymorphism (Bif-TRFLP) method to measure the bifidobacterial species content of fecal samples.

**Methods.** We isolated and characterized bifidobacterial species from a cohort of breast-fed infants. 106 infant fecal samples from the UC Davis Lactation study cohort representing four time points after birth (days 7, 21, 71 and 120) were chosen. Diluted feces were plated on bifidobacterial-selective medium and up to 10 colonies from each sample were isolated and passaged twice using streak-plate technique to ensure purity. These isolates were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS (Biotyper). Bif-TRFLP was also utilized to identify which

species were present in the fecal samples, using DNA extracted from feces by the Zymo Fecal Miniprep kit. Ninety-seven unique isolates were tested for growth on 2'-fucosyllactose, including isolates from both secretor- and non-secretor-fed infants. Isolates were cultured in modified MRS media with 3% 2FL, 3% lactose (positive control), and without carbohydrate (negative control). Their growth was monitored by plate reader in anaerobic chamber by measuring optical density at 600 nm.

**Results.** 382 bifidobacterial isolates were obtained from the feces of 38 breast-fed infants, across 78 samples. Isolates were identified by the MALDI Biotyper as *B. longum*, *B. breve*, *B. pseudocatenulatum*, *B. catenulatum*, *B. gallinarium*, *B. bifidum*, *B. dentium*, and *B. angulatum*. *B. breve* isolate relative abundance increased over time in non-secretor-fed infants while *B. longum* group increased in secretor-fed infants. It was discovered that approximately 25% of secretor fed infant isolates and 7% of non-secretor fed infant isolates were able to consume 2FL as sole carbon source. The species of the fecal isolates were overall representative of the Bif-TRFLP data, with *B. breve* proportionally overrepresented and *B. pseudocatenulatum* proportionally underrepresented.

**Discussion.** Differences in bifidobacterial population were observed in the feces of secretor-fed and non-secretor-fed infants, in particular in the abundance of *B. breve* and *B. longum*. More isolates from secretor-fed infants were able to consume 2' fucosyllactose than isolates from non-secretor-fed infants, reflecting the enrichment of species that can consume the oligosaccharides found in the mother's milk. There were differences in the relative species abundance identified by the Bif-TRFLP and isolation methods, although isolates were not obtained from all samples.

#### A057 THE SPECIES RANGE OF LACTOBACILLI IN THE MICROBIOTA OF PREGNANT WOMEN OF RUSSIAN IN NORMOCYNOSIS AND IN BACTERIAL VAGINOSIS

T.V. Pripitnevich, A.R. Melkumian, D.Y. Trofimov,  
G.R. Bayramova

Academician V.I. Kulakov research center for obstetrics, gynecology  
and perinatology under the Ministry of the health of the Russian  
Federation

**Objectives:** Determine the species range of lactobacilli in the vagina of pregnant women at normocynosis (N) and bacterial vaginosis (BV).

**Materials and Methods:** A comprehensive study of the vaginal microcynosis of 212 pregnant women using MALDI-TOF-MS method and quantitative PCR has been held. Lactobacilli were cultured in microaerophilic and strictly anaerobic conditions on nutrient media recommended by domestic and foreign manufacturers.

**Results:** Among examined (n = 212), H was detected in 51.4% and BV-in 11.8% of pregnant women. Women with H (n = 109) were divided into 3 subgroups. The 1<sup>st</sup> subgroup was with «absolute H» (n = 71), where in a dominating presence of lactobacilli, the absence of leukocytes and opportunistic pathogens (OP) was noticed. In the inoculation, *L. crispatus* prevailed in 87.3%. In the 2<sup>nd</sup> subgroup (n = 24), it was no leukocytes in smears, however presence of polymorphic microflora with the domination of lactomorphotypes was observed. In the inoculation in high titer (> 7 lg CFU/ml), *L. crispatus* (66.7%), *L. iners* (33.3%) were observed and in low titers-OP. In the 3<sup>rd</sup> subgroup (n = 14) with H, lactomorphotypes were dominated in the smears and leukocyte reaction was moderately expressed (57.1%) and expressed (42.6%). In the inoculation in low titers OP, such as

*CoNS* (100%), *E. faecalis* (28.6%) were observed. *L. crispatus* was isolated in 64.3% and *L. iners* in 35.7% of patients. Among the women with BV ( $n = 25$ ), lactomorphotypes were not identified in the smears in 76.0% of the cases. The growth of 18 species of lactobacilli was marked with the advantage of *L. iners* (84.0%), *L. vaginalis* (32.0%) and *L. gasseri* (28.0%).

**Conclusions:** Among the pregnant women with «absolute H», *L. crispatus* was dominated ( $87.3 \pm 7.8\%$ ). At the vast majority of women with BV (84.0% CI: 95.0%:59.9–95.8), *L. iners* was recognized in the high titer. It should be marked that *L. acidophilus* formed 0.3% in the pool of lactic acid bacteria of the vaginal microbiota of Russian population of pregnant women.

The lack of *L. iners* growth was noted on the selective medium for lactobacillus culture of Russian and foreign manufacturers. The studying of this species' cultivation showed the necessity of defibrinated blood existence in the medium composition and suppression of their growth at low pH, the aeration and impact analysis identified the preference of obligatory anaerobic conditions for growth of *L. iners*. Taking into account the indistinctive hemolytic activity for other lactobacilli, it is necessary to study the presence of pathogenic factors of *L. iners* and its role in the composition of the microbiota of vagina in normal stage and pathology.

#### **A058 BACTERIA-BACTERIOPHAGE ARMS RACE – A CHANCE TO MEET A PREDATOR**

**A. Rakin, E. Rogulin**

*Max von Pettenkofer-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität  
München*

Rapid development of resistance to therapeutic bacteriophages is one of the main obstacles preventing widespread application of bacteriophage therapy of bacterial infections. Bacteria modify their surface structures or develop various enzymatic machines to combat phages and their DNA. However, bacteria-phages interaction is a bilateral eco-evolutionary process in which the phage itself plays an active role and evolves to fit the new modified prey and environmental conditions. Phages outnumber bacteria 10 to 1 and thus increase the probability to combat bacteria with developed resistance to a former predator.

To follow bacteria-phage interactions and to demonstrate a possibility to be challenged with new lytic phages in the same ecological niche, we have selected sequentially phage resistant bacteria and their new predators. For this we have used a bacterium-phage pair consisting of an enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* subsp. *paleartica* Y11, O:3 strain and its lytic bacteriophages. All phages were isolated from the Waste Water Plant in Munich. Bacterial mutants that acquired resistance to their corresponding phages were challenged with the same waste water sample used for the isolation of the initial lytic phage. Whole genome sequencing of the phage-resistant bacteria and their corresponding phages allowed us to define genotypic variations in bacterial genomes aimed at overcoming phage challenges and to monitor phage variability. It was possible to associate certain bacterial and phage genes with the structures potentially involved in phage-bacterial interactions. Accordingly, similarities in the phage tail fiber protein patterns paralleled their host range activities and thus predict similarities in phage behavior.

Taken together, variations in genome sequences combined with overwhelming number of bacterial predators, bacteriophages, support unstable bacteria-bacteriophages coexistence in natural environments.

#### **A059 IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF STRAINS BIFIDOBACTERIUM LONGUM GT15, LACTOBACILLUS RHAMNOSUS K32, ENTEROCOCCUS FAECIUM L-3 IN VITRO**

**A.Y. Ratushny, O.V. Averina, V.N. Danilenko**

*Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia*

Characterizing of probiotic pharmaceuticals' immunomodulatory activity is a request of the moment (Fedorova, Danilenko, 2014; Preidis, Versalovic, 2009). Probiotic strains *B. longum* GT15, *L. rhamnosus* K32, *E. faecium* L-3 were selected and recommended as pharmaceuticals for ulcerative colitis treatment. Their immunomodulatory properties were estimated as the ability to influence expression of cytokines IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  in inflammatory state of human cell line THP-1. Living bacterial cells were cultivated together with human cells. Strain *B. longum* GT15 showed the most pronounced anti-inflammatory cytokine IL-10 expression, and it is convenient with already published data. However, this strain also increased anti-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-8 expression. *E. faecium* L-3 intensely increased level of anti-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-8. Strain *L. rhamnosus* K32 showed anti-inflammatory effect by decreasing level of TNF- $\alpha$  and IL-8 expression to the moment of 24 hours cocubation. Genomes of all three studied strains were completely sequenced and deposited in GenBank. Strain *L. rhamnosus* K32 (№ SUB168082) genome's size is 2 906 246 base pairs and contains 2742 genes. Strain *E. faecium* L-3 (№ SUB167269) genome's size is 2 629 318 bp and contains 2717 genes. Genome of strain *B. longum* GT15 (№ SUB167727) size is 2 309 998 bp and contains 1954 genes. Genes which encodes serpin, fimbrial subunits FimA, FimB, sortase-like protein, glycozide transferases and genes of cell adhesion molecules, including genes of pili and capsular exopolysaccharides, were found in annotated genome of strain *B. longum* GT15, using BLASTIN software. These genes potentially could take part in manifestation of this strain immunomodulatory properties. In future it is projected to study influence of these genes on the expression of anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines.

The study was implemented in the framework of a state contract with the Ministry of Education and Science of The Russian Federation 14.N08.12.0021.

#### **A060 REMEDIATION BY nZVI: IMPACT ON THE SOIL MICROBIAL COMMUNITY**

**A. Rónavári<sup>1</sup>, M. Balázs<sup>2</sup>, A. Németh<sup>2</sup>, E. Rutkai<sup>2</sup>, G. Urbán<sup>2</sup>,  
P. Tolmásov<sup>2</sup>, I. Kiss<sup>2</sup>, Kukovecz<sup>1,3</sup>, Z. Kónya<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup>*University of Szeged, Department of Applied and Environmental  
Chemistry, Rerrich ter 1, H-6720 Szeged*

<sup>2</sup>*Institute for Biotechnology, Bay Zoltán Foundation for Applied  
Research, Derkovits fasor 2, H-6726 Szeged, Hungary*

<sup>3</sup>*MTA-SZTE «Lendület» Porous Nanocomposites Research Group,  
Rerrich ter 1, H-6720 Szeged, Hungary*

<sup>4</sup>*MTA-SZTE Reaction Kinetics and Surface Chemistry Research  
Group, Rerrich ter 1, H-6720 Szeged, Hungary*

Nanoscale zero-valent iron (nZVI) is one of the most extensively used nanomaterials for the remediation of contaminated soil and groundwater targeting mainly chlorinated organic contaminants (e.g., PCB, TCE, pesticides) and inorganic anions (perchlorate) or metals (e.g. Cr (VI), As(III)).

In recent years, numerous studies have examined the impacts of nZVI on temperature, pH value, removal of contaminants, while little is known about how nZVI affects on microorganisms in soil and aquatic ecosystems.

In this study the effect of nZVI on microbial community of a groundwater were investigated. Four different types of

nanoscale zero-valent iron were synthesized and were tested and compared to each other in *cis*-1,2 dichloroethylene (cDCE) degradation.

In this contribution we are focusing on the comparison of the four nZVIs monitoring the changes in the microbial community of the environmental samples during the reduction process. nZVI can affect biological systems at cellular, sub-cellular and protein levels. The high reduction potential of nZVI can be toxic to endemic bacterial population, for this reason we examined bacterial population change during nZVI treatment using the recent developments in the analysis of microbiota (real-time/quantitative PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)).

We concluded that the different degradation pathway of cDCE by different nZVIs and their degradation products can stimulate or inhibit microbes.

This research was supported by the European Union and the State of Hungary, co-financed by the European Social Fund in the framework of TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 'National Excellence Program'.

#### **A061 THE FUNCTIONAL FIELD MAN AND MICROBE AND CONSEQUENCES IN MEDICINE**

**V. Rusch**

*Old Herborn University Foundation, Institute for Integrative Biology, D 35745 Herborn-Dill, Germany*

Recent discoveries led to a new image of man as microbes play a key role in any metazoan existence. Coevolution of host and microbiota resulted in symbiotic relationship. Man and microbes are partners in symbiosis. The value of the concept symbiosis resides in the widening of the concept of organism as structural unit to include heterogeneous systems as a functional unity or functional field. Indeed, man and microbes may represent an entangled system known from the phenomenon of quantum entanglement. Following this model, any change in the status of one of the symbiotic partners will necessarily be reflected in the other. The complex system of host and microbiota interactions became an important focus in research. The physiology of metazoans and its metabolic, immune and other functions are under intensive study and reveal that many functions are influenced by symbiotic microbial communities and that even brain and behaviour may be affected. A new appreciation of the immune system emerged, respectively, and the immune system now appears not as a defensive system, primarily, but organises the communication with microbes.

In medicine, it occurred that a special light is shed upon immunomodulation and microbes as preventive and therapeutic agents. Our group is involved in numerous experimental and clinical studies with microbiologies utilizing *E. coli* and *E. faecalis* and their impact in allergy, bronchitis, upper respiratory tract infections, the irritable bowel syndrome, and other clinical pictures. A mixture of recent data will be shown to illustrate how signals of viable or dead bacteria significantly affect experimental and clinical situations and exert regulatory effects upon host systems and immune functions.

#### **A062 FOOD, SYMBIOTIC MICROBIOTA AND THEIR ROLE IN THE EPIGENOMIC PROGRAMMING OF HUMAN HEALTH AND DISEASE**

**B.A. Shenderov**

*G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia*

Human phenotype is a result of complex interactions between eukaryotic, prokaryotic cells, viruses, archaea, their genotypes, epigenomes, exogenous and endogenous

environment factors. Foods and symbiotic gut microbiota play the most critical role in the epigenomic programming («EP») that describes the process through which exposure of life style of woman, as well as effect of environment exogenous and endogenous factors and agents during pregnancy and nursing period can stimulate or suppress fetal and newborn growth and development resulting in permanent functional and metabolic changes *in utero* and in offspring, and increase susceptibility or resistance to disease later in the infant, school, juvenile and adult age. Multiple LMW compounds of food or microbial origin having structural and functional resemblance are the essential participants of «EP» and reprogramming. These bioactives affect gene expression in human genome and microbiome resulting in modification of eukaryotic and prokaryotic cell growth, development, senescence, proliferation, DNA repair, quorum sensing, signaling, physiological, metabolic processing, health and diseases throughout life of the concrete individual. «EP» perturbations caused by under- or over-nutrition and/or host microecology imbalance in pregnant woman and infant during first the 1000 days are potentially capable to produce life-long unfavorable phenotypic consequences. Epigenomic DNA and chromatin remodeling is closely linked with cell energy processes. Prokaryote and eukaryote cells share common pathways for energy production, especially in the Krebs cycle. It means mitochondria of mammalian organisms and internal membranes of their symbiotic microbiota should consider to be both a collective metabolically active internal 'organ' affecting the host's energy metabolism and gene expression in the host mitochondrial, nuclear genomes and microbiome; dysfunctions of mitochondrial and/or bacterial energy metabolism may predispose to a wide spectrum of signal, metabolic and functional disturbance associated with epigenomic alterations. The provision of human being with required nutritional and regulator ingredients depends on how well the host is provided with balanced foods and what state of intestinal microecology host has. And so any deep and long-term deficiency or excess of nutrients and/or imbalance of symbiotic microbiota will induce disorders in the host metabolism, epigenetic regulation of gene expression, and damages to vital cell components. Epigenetic changes of gene expression connected with moderate diet disorders and/or microecological disturbance sometimes may be of the same order of magnitude as the damages caused by known environmental genotoxins. Manipulating the «EP» during all stages of human being life by including in his diet the special energy and epigenetic - based designed functional foods enriched with nutritional or microbial ingredients possessing metabolic and signal activity promise to form the best epigenomic developing program that prevent many metabolic diseases associated with DNA and chromatin remodeling caused by unfavorable life environments.

#### **A063 FEDERAL CRYOGENIC BANK OF NATURAL SYMBIOTIC MICROBIOCENOSSES OF HUMANS, ANIMALS, PLANTS, SOILS AND RESERVOIRS**

**B.A. Shenderov<sup>1</sup>, E.N. Gakhova<sup>2</sup>, S.A. Kaurova<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology,*

<sup>2</sup>*Institute of Cell Biophysics RAN, Puschino-na-Oke, Russia*

In nature, no biochemical processes occur without direct or indirect involvement of symbiotic microorganisms. These microbes have regulated both the early stages of the development of the biosphere and its further evolution.

They represent the leading biogenic factor that provides for the sustainability of the genome and epigenome of living organisms, the implementation of their genomic information under specific environment conditions, and global soil, hydrochemical and hydrobiological processes. They are to be taken into account while assessing various health risk factors. The impact of humankind on the environment is associated with global pollution by industrial and municipal waste products, drugs, and other xenobiotics that result in severe structural and functional disorders in evolutionary composed microbiocenoses of soil and reservoirs. The deterioration of soil, water, food quality and the conditions of their use negatively influences the microbial ecology of animal and plant living beings and calls for urgent human efforts aimed at maintaining the life of human beings on the Earth and the whole Earth's biodiversity. The increasing microecological imbalance at all biosphere levels should be considered the leading factor of the health risks that are faced by modern humankind and are caused by infections as well as metabolic and psychic diseases. Because of the possible negative consequences of the deterioration of our planet's microecology, it is imperative that the first Federal cryogenic bank of natural symbiotic microbiocenoses of humans, animals, plants, soils and internal water reservoirs («Cryogenic bank») should be established in the Russian Federation for long-term maintenance of symbiotic complexes of different microorganisms in their native state. Cryo-conservation enables us not only to maintain natural microbiocenoses but also to use them for various scientific fundamental and applied investigations, including the introduction of novel critical technologies in medicine, animal husbandry, plant-growing, food industry, and ecology. Microbiocenoses placed in the Cryogenic banks could become important resources to be used for designing personalized foodstuffs, drugs, microbial fertilizers and pollutant destructors, tools for soil and water reservoir remediation and for developing other biotechnology fields that use representatives of symbiotic microbiota and its genetic and metabolic potentials. The authors of this abstract have a patent confirming the priority rights of Russian science concerning the creation of a Cryogenic bank. On the basis of the Institute of Cell Biophysics in 1996, a laboratory-level Cryogenic Bank project has been launched, a large number of essential methods and programs of cryo-conservation have been designed; optimal cryo-conservants, tools for the evaluation of the viability of «frozen» microorganisms, and the necessary equipment have been developed or selected. The Federal «Cryogenic Bank» and its branches are to be established arranged in all republics of the former Soviet Union and beyond its boundaries.

#### **A064 LIPID AND FATTY ACID COMPOSITION OF POTENTIALLY PROBIOTIC STRAIN BIFIDOBACTERIUM LONGUM BIM B-646**

A. Sidarenka<sup>1</sup>, M. Paschiak<sup>2</sup>, G. Novik<sup>1</sup>, A. Gamian<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Microbiology NASB, Minsk, Belarus

<sup>2</sup>Institute of Immunology and Experimental Therapy PAS, Wroclaw, Poland

Analysis of lipid and fatty acid composition of potentially probiotic strain *Bifidobacterium longum* BIM B-646, isolated from feces of healthy adult in Belarus, was performed.

Extracted lipids constituted ~2.5% of dry biomass of *B. longum* BIM B-646. Analysis of total lipid extract from *B. longum* BIM B-646 by one-dimensional thin layer chromatography (TLC) demonstrated the presence

of phosphorus-containing lipids (PL), glycolipids (GL) and lipids with free amino groups (AL) with different chromatographic mobility (PL –  $R_f=0.25$ ,  $R_f=0.35$ ,  $R_f=0.40$ ,  $R_f=0.45$ ; GL –  $R_f=0.14$ ,  $R_f=0.22$ ,  $R_f=0.25$ ,  $R_f=0.35$ ,  $R_f=0.40$ ,  $R_f=0.8$ ; AL –  $R_f=0.40$ ). Comparative analysis of lipid extract of bifidobacteria and phospholipid standards – diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), phosphatidic acid (PA), by one-dimensional and two-dimensional TLC revealed that PG ( $R_f=0.45$ ) is one of the dominant PL in *B. longum* BIM B-646. Other PLs were not similar to phospholipid standards in their chromatographic mobility. The lipid profile of *B. longum* BIM B-646 was obtained by matrix assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Mass spectra of lipid extract components of bifidobacteria were observed at  $m/z$  478.7, 780.6, 1459.5, 1573.4, 1601.3, 1613.9, 1628.6, 1669.9.

The fatty acid (FA) composition of *B. longum* BIM B-646 was determined using gas-liquid chromatography/mass-spectrometry (GLC/MS). Major FA constituents of bifidobacteria were normal  $C_{14:0}$ ,  $C_{16:0}$ ,  $C_{18:0}$  saturated acids, monoenic  $C_{16:1}$ ,  $C_{18:1}$  and cyclopropane cyc- $C_{19}$  acids. The hexadecanoic acid constituted 36–50% of total FA, followed by octadecanoic (8–23%), tetradecanoic (7–15%), octadecanoic (6–19%), lactobacillic (cyclopropane) (10–16%) and hexadecanoic (3–5%) acids. The proportion of individual FA of bifidobacteria depended on growth conditions and method of extraction.

The further study of the lipid components of *B. longum* BIM B-646 should be performed to determine their chemical structure, biological activity and possible role in probiotic action.

#### **A065 ROUTINE WHOLE GENOME SEQUENCING OF BOVINE TUBERCULOSIS**

N.H. Smith

Animal Health and Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, Surrey, UK

The *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTB complex) of bacteria consists of a group of closely related strains, all causing a similar disease, in a variety of mammalian hosts. From a human point of view the most important member of the complex is *Mycobacterium tuberculosis* the human adapted pathogen that is responsible for the most deadly bacterial disease of mankind; tuberculosis. Members of the MTB Complex are remarkable because there is no empirical evidence of the transfer of genes between strains. This population structure means it is very easy, using molecular techniques, to identify groups of strains with similar characteristics and over seven species have been named among strains that less than half the nucleotide sequence diversity found in the human species. It has been suggested that these different host adapted species should be referred to as 'ecotypes' of *M. tuberculosis* rather than separate species.

In the UK, disease in cattle caused by *Mycobacterium bovis* (bovine tuberculosis), a member of the MTB complex, is an important issue with over 3000 herd breakdowns a year. We genotype, using traditional molecular methods, at least one isolate from each breakdown to assist in the management of the disease and to advise Defra policy.

The development of 'desktop' Whole Genome Sequencing (WGS) machines has made WGS for routine



genotype and phylogenetic analysis a viable proposition. The key breakthrough was establishing that high-quality WGS could be obtained from 'heat-killed cells' without any further purification of bacterial chromosomal DNA. These two developments mean that routine WGS for species identification, genotyping, phylogenetic analysis and epidemiology is now an economically feasible replacement for standard (spoligotype and/or VNTR) genotyping pipelines dealing with up to 5000 bTB isolates a year.

Using a series of targeted case studies based on over 500 isolates I will show how WGS data can give greater insights into specific epidemiological questions while at the same time maintaining the standard genotyping nomenclature that our customers have come to expect in GB. A WGS based phylogeny of the animal-adapted, RD9 deleted lineage of the MTB complex will be presented and the use of 'molecular clocks' discussed.

#### **A066 CRISPR GENETIC DIVERSITY STUDIES AND HIGH-THROUGHPUT GENOMIC TOOLS TO STUDY THE EVOLUTION AND CONTROL OF BACTERIAL INFECTIOUS DISEASES: THE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX MODEL**

C. Sola

*Infection Genetics Emerging Pathogen Evolution (IGEPE) Team, Institut de Génétique et Microbiologie, UMR8621, CNRS-Université Paris-Sud (CNRS-UPS), Orsay, France*

**Introduction.** Clustured Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats (CRISPR) loci were discovered at the end of the 1980s, though designated as such only in 2002. Their role in adaptative anti-phage immunity in coordination with CRISPR-associated *cas* genes, and in other physiological mechanisms, created a new field in applied and academic research. CRISPR-associated *cas* genes encode proteins with functional domains typical of nucleases, helicases, polymerases and polynucleotide-binding activities. With the advent of prokaryotic RNA interference role linked to CRISPR, regulation of gene expression in bacteria and archaea changed paradigm putting a new emphasis on mechanisms of lateral gene transfer and phage-based gene flows, which likely play important functions in species physiology and evolution. The Cas9 protein recently provided new exciting eucaryotic genomes editing tools. I will review discoveries on CRISPR interference mechanisms in some models and provide much more detailed information on how CRISPR systems were characterized on the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) whether for academic research on tuberculosis evolution history or for operational research.

**Materials and methods.** I will review recent innovations on new high-throughput genomic methods using CRISPR and SNPs, that were developed and applied to *Mycobacterium tuberculosis* and other bacterial pathogens such as *Salmonella enterica* or *Legionella pneumophila*. I will further show how new assays such as the TB-SPRINT (tuberculosis spoligotyping rifampin-isoniazid typing) and a TB-SPRINTplus (that include second-lane drug-resistance gene typing) could become game changers for multiresistant (MDR) and ultra-resistant (XDR)-tuberculosis control.

**Results.** I will show how these newly developed methods were used for an improved TB control in various countries using recently studies performed in Africa, South-America and Asia.

**Conclusion.** We provide new public health perspectives for Africa and for some former USSR-republics where

these new methods could be implemented for a better public health control. Innovation in genomics, helped by public-private partnership such as the one recently launched by the CNRS-UPS could help to improve international public health efficiency and allow to build new international partnerships between Europe, Russia and former USSR-republics.

#### **A067 MODERN ASPECTS SINECOLOGY OF HUMAN COLON SYMBIOTIC MICROORGANISMS**

I.V. Solovyeva<sup>1</sup>, I.V. Belova<sup>1</sup>, A.G. Tochilina<sup>1</sup>, A.N. Varichev<sup>2</sup>, T.P. Ivanova<sup>1</sup>, V.A. Zhirnov<sup>1</sup>

*Nizhny Novgorod scientific and research institute of epidemiology and microbiology name acad. I.N. Blokhina<sup>1</sup>, N. I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Russia*

One of the most important directions of sinecological research are the study of species structure of the human microbiota and the laws of its organization. Species structure of communities of living organisms includes the analysis of the number of species (species richness) and their relative representation (amounts) (species diversity). Interest to studying the diversity of biota and its evaluation methods are caused by relevance of studying the laws of its spatial and temporal variation. The value of diversity is often considered as an indicator of the state of ecosystems. Methods for assessing species diversity are constantly improving. It is estimated both number of types of communities, and their uniformity (uniformity of distribution of species abundance). At that high uniformity, when the abundance of species of equal or nearly equal, is considered equivalent to a high diversity.

There were seven age groups during the research identified and the criteria for assessing the health status of each group to select categories of «healthy» and «sick» defined. The qualitative and quantitative structure of a microbiocenosis of a large intestine of 3268 «healthy» and «sick» people is studied. The list of 29 indicators characterizing structure of a microbiocenosis of a lumen of a large intestine is defined. An electronic database and database management system are created. The database is structured.

Checking data normality was performed using statistical tests of Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk. Statistical analysis using the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests revealed «information relevant indicators», the number of which varies significantly as in «healthy» and «sick» people of the same age and between age groups. Comparison of microbiocenoses «healthy» and «sick» people, conducted by analyzing the rank distributions, clearly demonstrated the difference microbiocenoses both in number of indicators (number of changes), and on the species of symbiotic microbial community structure in all age groups. Cluster analysis of the data by the Ward and K-means methods allowed to verify the correctness of the age groups structuring (0–6 days, 7–29 days, 1–11 months, 1–6 years, 7–17 years, 18–59 years, 60 years and older) and confirmed the difference microbiocenoses colon «healthy» and «sick» people. It is proved that the total number of communities of symbiotic microorganisms in the large intestine of «healthy» people is one-two orders higher, than at «sick» ( $p < 0.05$ ) in all age groups except the group 60 years and older. It is proved that all ecological laws and dependences are true for the human's microbiota. And all patterns that are typical for the microbial community represented by 29 indicators, retained and developed for the general population.

### **A068 THE MAIN BIOCHEMICAL PROPERTIES OF THE LACTOBACILLI STRAINS FROM THERAPEUTIC-PREVENTIVE BEVERAGE KURUNGA**

L.G. Stoyanova, M.V. Napalkova, A.V. Chaplin, A.I. Netrusov  
*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

**Introduction.** Kurunga is a dairy drink of mixed lactic acid and alcoholic fermentation characterized by high biological value upon protein and fatty acid composition, vitamins and mineral substances and physiological activity of microbiota contained lactobacilli, lactococci, bifidobacteria and yeast. It's known as powerful drink to prevent diseases of the gastrointestinal tract and cardiovascular system, to cure of tuberculosis etc. Among the probiotic correctors of normal microbiota special interest present the lactobacilli, isolated from national products with therapeutic – preventive effect.

**Aim of the research:** the study biochemical properties of the effective lactobacilli strains isolated from kurunga as probiotic cultures.

**Methods.** The isolated cultures were identified using the common microbiological methods and phylogenetic analysis encoding the sequence *16S rRNA* genes. The antibiotic activities of strains was determined by measurement of growth inhibition zone of test-cultures. For determination of volatile fatty acids in the culture broth used the GLC- method. Proteolytic activity was determined at the various levels of pH (3,0-7,0).

**Results.** The isolated two lactobacilli strains were identified as *Lactobacillus diolivorans* KL-1 and KL-2 (GenBank database KJ870234 and KC438372). These strains suppressed the growth pathogens (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella* sp.) and also possessed fungicidal action (on *Penicillium*, *Aspergillus* sp, *Candida* sp). Lactobacilli KL-1 and KL-2 accumulated a large amount of acetic acid, but caprylic acid was detected in culture broth of KL-1, which correlates with its high antifungal activity. In model experiments on the example of action of hydrochloric and bile acids was shown high survival rate of strains in the specific conditions of the gastrointestinal tract. The strain KL-1 has low proteolytic activity at pH 3,0 ( $4,74 \cdot 10^{-3}$  PU/ml) and high activity at pH 7,0 ( $713,68 \cdot 10^{-3}$  PU/ml).

**Discussion.** The isolated strains of *Lactobacillus diolivorans* have «GRAS» status. Thus, the unique properties of the strains, such as stability under gastrointestinal tract, a wide spectrum of bactericidal and fungicidal action, including for pathogens that cause human gastroenteritis infection and cause toxic and also their proteolytic activity, allows to recommend them to create probiotic cultures.

### **A069 WHOLE GENOME SEQUENCING TO STUDY MOLECULAR EPIDEMIOLOGY AND EVOLUTION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

P. Supply

*Center for Infection and Immunity of Lille, INSERM 1019 CNRS UMR 8204, Institut Pasteur de Lille, France*

Improving the epidemiological surveillance and diagnostics of tuberculosis (TB) is especially necessary in the context of the rising threat of multi- or extremely drug resistant strains. *Mycobacterium tuberculosis* is often insidiously transmitted in the population and is genetically homogeneous, which complicates its epidemiological tracing by classical genotyping. By enabling comprehensive, whole genome sequence (WGS)-based exploitation of microbial genetic information,

next-generation sequencing (NGS) opens the way towards improving both disease control and diagnostics. Rapid improvements and increasing affordability of these technologies render possible their extended use. So-called bench top NGS systems can be integrated in a routine workflow, with a throughput adapted to a normal microbiological laboratory. Available easy-to-use kits for DNA library preparation and sample multiplexing now require only low amounts of genomic DNA, which limits the time needed for culturing the slow growing mycobacteria.

The use of NGS-based pathogen surveillance, diagnostics and research is evaluated in the frame of the FP7-funded Patho-NGen-Trace collaborative project, comprising WGS of more than 1,800 isolates of *M. tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* and *Campylobacter jejuni*. This project also includes an important component on new integrated bioinformatics pipelines for rapid and easy WGS data analysis and interpretation. As a proof-of-principle, we recently showed that, compared to classical genotyping, WGS of *M. tuberculosis* allows better resolution of a complex outbreak situation, by more precisely distinguishing isolates belonging to a specific recent transmission chain from other, closely but not directly related isolates (Roetzer et al. PLoS Medicine, 2013). This higher resolution also enables better detection of more contagious cases and/or more epidemic subclones, which represents useful information for TB control and research questions. We also used WGS-based analyses of rare human TB-causing strains to identify the origin of the successful global expansion of *M. tuberculosis*, which opens the way to the identification of novel mycobacterial factors involved in the virulence of the pathogen (Supply et al., Nature Genetics, 2013).

### **A070 INTESTINAL MICROBIOTA CAN INFLUENCE ON THE COURSE OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS IN RATS**

E. Tarasova, I. Abdurasulova, A. Matsulevich, M. Kotyleva, A. Eliseev, V. Klimenko, E. Ermolenko, A. Suvorov  
*Institute of Experimental Medicine of RAMS, St. Petersburg, Russia*

**Introduction.** Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory autoimmune disease of central nervous system (CNS). Infectious factors (viruses or bacteria) can play a role of a trigger mechanism leading to the development of autoimmune process in MS. The intestinal microbiota influences on metabolic, immunological functions and provides colonization resistance of host organism. The presence of intestinal dysbiosis in patients with MS, and data getting on the model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), suggest that intestinal microbiota can influence on the development and course of the MS disease.

The aim of this work was to compare the composition of gut microbiota on the EAE course in rats with paralysis of limb and rats without clinical symptoms.

**Materials and methods.** EAE was induced in female Wistar rats by inoculation of homological spinal cord homogenate (HSCH) with complete Freund's adjuvant. The severity of neurological disorders was estimated by clinical index (c.i.) from 0 (without disorders) to 6 (mortality). The fecal samples were collected to study composition of gut microbiota by real time PCR method before any consumption, on the 10<sup>th</sup> and 21<sup>th</sup> days after EAE induction. Also, gut

microbiota was studied by bacteriological method on the 10<sup>th</sup> day of experiment.

**Results.** Inoculation of spinal cord homogenate induced paralysis and paresis in 97% of rats. The analysis of microbiota composition by RT-PCR method before the EAE induction showed the high level of *Enterococcus spp.* in the grope of animals without any symptoms of the EAE (c.i. 0; group A). The presence of a large number of pathogenic bacteria (*Proteus mirabilis*, *Citrobacter diversus*, *Staphylococcus epidermidis*) in fecal samples of animals with neurological disorders (c.i. 3,5-5,5; group B) was revealed on the peak of clinical manifestations (10<sup>th</sup> day) using booth methods (bacteriological and RT-PCR). At the same time the decrease of the number of *Lactobacillus spp.*, *E. coli*, *Enterococcus spp.* was detected bacteriologically in this group. On the 21<sup>th</sup> day of experiment RT-PCR method showed the reduction of the number of *Lactobacillus spp.* in fecal samples of rats from grope B and meaningful increase in the number of *Faecalibacterium prausnitzii* in animals from grope A.

**Conclusion.** Intestinal microbiota influence on the development of EAE. The increase of content of *Enterococcus spp.* and *F. prausnitzii* in gut microbiota of rats with EAE is a good prognostic sign for the course of this disease, but the presence of a large number of pathogenic bacteria correlated with severe course of EAE.

Work was supported by grant RFBR 13-04-01861.

#### **A071 CENTRALIZED MANAGEMENT OF A GNOTOBIOTIC RESEARCH ANIMAL FACILITY WITHIN AN ACADEMIC INSTITUTION: KEY COMPONENTS FOR SUCCESS**

**B.R. Theriault**

*The University of Chicago, USA*

In recent years there has been a new wave of research interest exploring the role that the host microbiome may play in multiple areas of health and disease. Utilizing the powerful combination of genetically engineered mice maintained germ free or with defined flora, researchers have an enhanced ability to dissect the multifactorial influences contributing to disease pathways. Although a number of academic institutions have principal investigators managing and maintaining mouse colonies in gnotobiotic and germ free isolators, few operate flexible film isolator facilities that are entirely managed and operated by the centralized animal resource program. To assist researchers interested in conducting studies utilizing gnotobiotic and germ free mice at our institution, we developed a centrally managed Gnotobiotic Research Animal Facility (GRAF). Several key components have contributed to the success of our program. The program has strong institutional support and the facility was designed with input from all stake holders. A clinical veterinarian maintains primary oversight of the facility and program and also provides consultation on experimental procedures and implementation of study design. A committee of stakeholders was formed to facilitate collaborations and optimize timing of studies and resources. A dedicated husbandry staff with interest in gnotobiotic technology was identified and a program of enhanced training developed for this dedicated staff. Redundancy in critical equipment and operations were implemented as well as high level documentation established to optimize facility operations. Using this model, our facility has grown from a single flexible film isolator to maintenance of over forty flexible film isolators at any given time as well as expansion of dedicated staff from a single part time individual to a full time assistant

supervisor, two full time husbandry care technicians and two full time colony management technicians over an eight year period of time. As interest in microbiome research continues to expand in the United States, as it has in other countries, our model of a centralized gnotobiotic research animal facility is positioned to support the scientific needs of multiple principal investigators within a campus community and is predicted to become the preferred model of facility development and resource allocation.

#### **A072 ISOLATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM LOCAL ARMENIAN DAIRY PRODUCTS**

**F.N. Tkhruni, Ts.R. Balabekyan, K.J. Karapetyan, A.M. Isakhanyan**

*SPC «Armbiotechnology», NAS, Armenia*

Recent scientific investigation concept of investigations in the probiotic field has been expanded to include bacteria isolated from fermented dairy products beside those from intestinal origin. During the creation of probiotics a major problem is selection of strains which are specific to human intestinal microbiocenosis. In this case there was set a task select lactic acid bacteria (LAB) species which would be promising as starter cultures and to investigate their antimicrobial and probiotic properties, phenomenon of antagonism and/or synergism between them. More than 200 strains of LAB were isolated from traditional acid-lactic product Matsun and salted cheese from rural households from alpien regions of Armenia. Investigation of basic probiotic properties prove, that some of LAB strains have properties meeting WHO requirements to probiotics. The genotyping of selected strains (API 50 CH, 16S rRNA sequencing, GS-PCR, RAPD PCR) showed that they were presented by *Lactobacillus rhamnosus 109*, *L. plantarum 65*, *L. plantarum 66*, *L. pentosus 28*, *Streptococcus lactis 103* and *Enterococcus faecium 64* species. Strains of LAB are deposited in "Microbial Depository Center" (MDC) *SPC "Armbiotechnology"*.

On the basis of separately investigation of antimicrobial, morphophysiological, organoleptic and technological parameters of LAB, the most perspective ones were chosen. The combined cultivation of following starter cultures *L. plantarum 66* and *Streptococcus lactis 103*, *Streptococcus lactis 103* and *L. rhamnosus 109*, *L. rhamnosus 109* and *L. plantarum 66* showed, that total count of each bacteria after growing made in average  $4.6 \times 10^9$  CFU/ml, but obtained products differ by their antimicrobial activity. Obtained products tested on organoleptic (texture, flavor, pH, acidity, density), physicochemical, microbiological parameters. The best results were obtained after co-cultivation of *L. rhamnosus 109* and *L. plantarum 66* strains.

It was shown that obtained new products possessed antimicrobial activity against broad spectrum of microorganisms of different taxonomic group. So, these strains can be recommended as a basis for creation of probiotics or new complex preparation for functional assignment with antimicrobial properties.

#### **A073 NATURE OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF LACTOBACILLUS RHAMNOSUS**

**F.N. Tkhruni<sup>1</sup>, K.J. Karapetyan<sup>1</sup>, S.G. Chailyan<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*SPC «Armbiotechnology», NAS, Armenia*

<sup>2</sup>*Institute of Biochemistry of NAS, Armenia*

Research that has been ongoing last 60 years to identify novel antibiotics, has led to one of the most promising new concepts in antimicrobial technology – the use of peptides

as antimicrobial agents (AMP). AMPs have a broad range of activity and are excellent candidates for development of new prophylactic and therapeutic substances to replace conventional antibiotics. The antimicrobial properties of *Lactobacillus rhamnosus* BTK-109 endemic culture were studied.

The biologically active peptides were isolated from cultural broth of *L. rhamnosus* BTK-109 strain and partially purified by combination of adsorption-desorption, ion-exchange chromatography and HPLC methods. Isoelectric focusing revealed that there are two cationic substances ( $pI$  about 6.45 and 4.58). Mass analysis indicate that these compounds (BCN) have peptide bonds. Spectrograms demonstrate that molecular weight of BCN 1 and BCN 2 are 1420 Da and 700 Da respectively. The antimicrobial activity of bacteriocins was diminished by the proteolytic action of trypsin and proteinase K. BCNs preserved its biological activity in the temperature range 40–100°C (30 min), were stable in the pH range 2–9 and demonstrated maximum activity at pH 4.0–5.0. BCNs shown different antimicrobial activity against broad spectrum of microorganisms of different taxonomic group and etiology. They were effective against gram-negative and gram-positive microbes (*F. tularensis*, *V. cholerae*, *Y. pestis*, *B. anthracis*, *B. anthracoides*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *L. monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Staph. aureus*, *Ps. aeruginosa*, *E. cloacae* sp.). The diverse efficiency of growth inhibition may be related with the different mechanisms of action of the substances towards bacteria cell membrane. Thus, the probiotic strain *L. rhamnosus* 109 produces the antimicrobial substances proteinaceous in nature with bacteriocin characteristics. The results of the investigation allow confirming that obtained peptides can be used as alternative agents to antibiotics for the prevention or treatment of infectious diseases.

This work was realized with financial support of the Project Global Initiatives for Proliferation Prevention (GIPP) T2- 298.

#### **A074 SHIGA TOXIN-CONVERTING PHAGES AND THE EMERGENCE OF NEW PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI*: A WORLD IN MOTION**

**R. Tozzoli, L. Grande, V. Michelacci, P. Ranieri, A. Maugliani, A. Caprioli, S. Morabito**

*European Reference Laboratory for Escherichia coli, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, Rome 00161, Italy*

Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* (STEC) are pathogenic *E. coli* causing diarrhea, hemorrhagic colitis (HC) and hemolytic uremic syndrome (HUS). STEC are characterized by the presence of bacteriophages conveying the genes encoding the Shiga toxins (Stx), potent cytotoxins that induce the cell death by blocking the protein synthesis. STEC isolated from the most severe form of infection, typically the HC and HUS, usually possess the ability of inducing the attaching and effacing (A/E) lesion to the enterocyte, an adhesion mechanism shared with Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), even though sometimes this virulence feature is lacking. In the very recent times, a different type of STEC broke the scene and caused a large outbreak with more than 800 HUS and 50 deaths. Such a strain was an Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) that had acquired a bacteriophage harbouring the Stx-coding genes causing a shift in the paradigm for HUS-associated STEC. We investigated the whole genome sequences of the stx-phages described so far in Stx-producing EAggEC, also termed Enteroaggregative Hemorrhagic *E. coli* (EA-

HEC), in order to understand the bases of the emergence of this new *E. coli* pathogroup. Additionally we investigated the possibility that, besides EPEC and EAggEC, other pathogenic *E. coli* could be susceptible to infection with stx-phages. We found that at least two different stx2-phage types, both characterized by the presence of a peculiar tail fiber-coding gene, intervened in the appearance of EA-HEC indicating that the stable emergence of such STEC might have been mediated by the adaptation of stx-phages to this pathogroup. Additionally, we observed that, at least in the laboratory conditions, all the *E. coli* pathogroups assayed were susceptible to the infection with a panel of stx-phages. Our results suggest that the event of stx-phages acquisition might involve a spectrum of *E. coli* pathogroups wider than expected.

#### **A075 THE EFFECT OF A MULTISPECIES PROBIOTIC ON THE INTESTINAL MICROBIOTA DURING ANTIBIOTIC THERAPY**

**Y. Uspenskiy<sup>1</sup>, Y. Fominykh<sup>1</sup>, S. Zakharenko<sup>2</sup>, C. Koning<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>PSPSMU n.a. I.P. Pavlov, St-Petersburg, Russia

<sup>2</sup>VMA n.a. S.M. Kirov, St-Petersburg, Russia

<sup>3</sup>Winlove b.v., Amsterdam, Netherlands

**Background and objective:** Antibiotic intake causes a marked and sustained disturbance of the intestinal microbiota resulting in long-term health consequences. Probiotics have shown to be able to prevent these disturbances. However, different probiotics (both mono- and multispecies) and treatment strategies (during or after antibiotic therapy (ABT)) are used. The aim of this study was to investigate the efficacy and safety of a multispecies probiotic «Rioflora®Balance» during and directly after ABT.

**Materials and methods:** Patients treated with ABT for focal pneumonia were randomized into three groups: group 1 received 2 capsules Rioflora®Balance twice daily (10<sup>10</sup>cfu/day) for 14 days in parallel with ABT; group 2-2 capsules Rioflora®Balance twice daily (10<sup>10</sup>cfu/day) for 14 days directly after cessation of ABT; group 3 - ABT only. At the start and end of ABT/multispecies probiotic supplementation complaints were assessed by the treating physician. Moreover, gas chromatography was applied to investigate the dynamics of the small intestinal microbiota and quantitative PCR was used to determine changes in the colonic microbiota.

**Results:** 120 patients completed the study. ABT had a profound influence on the small and large microbiota (increase *C. difficile*, *Candida*, and *E. coli*; decrease *bifidobacteria*, *lactobacilli*, and *B. fragilis*). Multispecies probiotic supplementation was able to completely counteract these antibiotic induced disturbances of the microbiota. Moreover, an increase of both small intestinal and colonic *bifidobacteria* and *lactobacilli* was observed. Supplementation of the multispecies probiotic in parallel with ABT was characterized by a more pronounced effect than supplementation after cessation of ABT. No adverse events were reported. No antibiotic associated diarrhea was observed in any of the patients.

**Conclusion:** The intestinal microbiota was markedly affected by ABT. Although the exact long-term consequences of this disturbance need to be fully elucidated it is strongly associated with a negative impact on health. Supplementation with the multispecies probiotic Rioflora®Balance is safe and effective in preventing antibiotic induced disturbances of the intestinal microbiota. Moreover, multispecies probiotic supplementation appears to be more effective if started at the start of ABT than after cessation.

## A076 INTRINSICALLY DISORDERED PROTEINS

V.N. Uversky

*Institute for Biological Instrumentation, Russian Academy of Sciences, 142292 Pushchino, Moscow Region, Russia; Department of Molecular Medicine, University of South Florida, Tampa, Florida 33612, USA*

Intrinsically disordered proteins (IDPs) lack stable tertiary and/or secondary structure under physiological conditions *in vitro*. Computational studies revealed that IDPs are highly abundant in nature, as ~25-30% of eukaryotic proteins are mostly disordered, and >50% of eukaryotic proteins and > 70% of signaling proteins have long disordered regions. The functional repertoire of IDPs is complementary to that of ordered proteins, with IDPs being commonly involved in regulation, signaling and control pathways, where binding to multiple partners and high-specificity/low-affinity interactions play a crucial role. It is suggested that functions of IDPs may arise from the specific disorder form, from inter-conversion of disordered forms, or from transitions between disordered and ordered conformations. The choice between these conformations is determined by the peculiarities of the protein environment, and many IDPs possess an exceptional ability to be highly responsive to change in their environment and to fold in a template-dependent manner. Intrinsically disordered regions are frequently encoded by mRNA sequences subjected to alternative splicing. This association between alternative splicing and intrinsic disorder helps proteins to avoid folding difficulties and provides a novel mechanism for developing tissue-specific protein interaction networks. Numerous IDPs are commonly associated with human diseases, including most devastating maladies such as cancer, cardiovascular disease, amyloidoses, neurodegenerative diseases, diabetes, etc. Therefore, IDPs are novel and very attractive but difficult drug targets. The difficulties come from several directions including the binding promiscuity of IDPs and the disordered and highly dynamic nature of their binding sites. For a long time the targeting of protein clouds was considered infeasible. Data have now emerged showing that selective blocking of specific interactions of IDPs with their protein binding partners is possible. Several strategies have been elaborated for elucidating the mechanisms of blocking of intrinsic disorder-based protein-protein interactions.

## A077 STUDY OF THE MECHANISMS OF PROBIOTIC ACTIVITIES BY OF THE BLOOD SAMPLES FROM EXPERIMENTAL ANIMALS USING METABOLOME ANALYSIS

T.Ya. Vakhitov<sup>1</sup>, V.A. Utsal<sup>2</sup>, S.I. Sitkin<sup>1,3</sup>, E.V. Chernyaeva<sup>1</sup>, T.S. Egorova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint-Petersburg, Russian Federation

<sup>2</sup>Institute of Toxicology, Saint-Petersburg, Russia

<sup>3</sup>State Medical University n.a. I.I.Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

In this work we investigated the effects of Actoflor-C, a probiotic bacterial metabolite complex composed of twelve identified carbonic and amino acids, and of Vitaflor-forte based on two *Lactobacillus acidophilus* strains and on some Actoflor-C metabolite compounds.

In the experiments, two groups of white outbred mice, female were used. Mice were intragastrically given with Actoflor-C and Vitaflor-forte (200 mcl/mouse) for three days at standard feeding, and on day 4 - on empty stomach. Three hours post-administration, blood samples were taken from mice.

Mass-spectrometry-based profiling (GCMS-QP20110 Plus spectrometer) of mice blood sera allowed identification of about 70 metabolite including low molecular carbonic and amino acids. Dominant component analysis showed statistically significant blood metabolite concentration changes (60% and 84%) produced by Actoflor-C and Vitaflor-forte, respectively. Concentrations of metabolite compounds (67% of metabolites) were mainly increased after administration of Vitaflor-forte, while were increased or reduced for approximately equal number of compounds (28% and 31%, respectively) after administration of Actoflor-C.

Actoflor-C and Vitaflor-forte were demonstrated to exert somewhat similar and at the same time different effects – concentrations of 45% of metabolite were changed symbiotically, while 25% – antibiologically. This fact allowed to conclude that bacterial metabolites produced direct regulatory effect on the host and the host microbiota. The first is likely to result in a reduction of concentrations of coded and non-coded amino acids and in change in concentrations of some other compounds, while the second - in an increase of carbonic acids levels. Based on the pattern of changes, we can conclude that Vitaflor-forte mainly stimulated growth of bifidobacteria and of butyrate-synthesizing bacteria (*Faecalibacterium prausnitzii* and *Roseburia intestinalis*), while Actoflor\_C – of enteric bacteria.

The model to study the mechanisms of probiotic activities of bacteria and of their metabolome may be used further in the experiments with gnotobiotics.

## A078 THE USE OF STABLE ISOTOPE TECHNOLOGY TO DECIPHER MICROBIAL ACTIVITY IN THE GUT – IN VITRO AND IN VIVO

K. Venema

*Beneficial Microbes Consultancy, Wageningen, The Netherlands*

The gut microbiota has been implicated in health and disease. However, the exact mechanisms are unclear. This contribution describes the application of stable-isotope labeled substrates (primarily <sup>13</sup>C-labeled) to study in close detail fermentation of substrates by the human colonic microbiota. The tools were developed in a validated, computer-controlled, dynamic *in vitro* model of the colon (TNO's TIM-2), but application of the tools in human volunteers is exemplified as well. Using stable-isotope (<sup>13</sup>C)-labeled carbohydrates (inulin, starch, GOS, lactose and 6'-sialyl-lactose) the following tools were set-up: a) 16S rRNA-based stable isotope probing (SIP) to determine which microbes are involved in the fermentation of the substrates; b) a dedicated LC-MS method to study <sup>13</sup>C-labeling patterns in short-chain fatty acids and amino acids; c) a dedicated 2-dimensional NMR protocols to determine <sup>13</sup>C-label distribution within the major microbial metabolites; d) a catheter to deliver <sup>13</sup>C-labeled substrates in the human colon *in vivo*.

The contribution will highlight the results obtained with the different substrates. For instance, the food-chain for the use of <sup>13</sup>C-starch will be shown, where within the complex microbiota *Ruminococcus bromii*

produces  $^{13}\text{C}$ -acetate that is used subsequently through cross-feeding by *Eubacterium rectale* to produce butyrate. Propionate production, which can go through either the acrylate-pathway or the succinate decarboxylation-pathway, is regulated differently between different carbohydrate substrates: e.g., upon  $^{13}\text{C}$ -starch fermentation, only the succinate decarboxylation-pathway is active, while for substrates that are fermented swiftly, use is made of the acrylate pathway as well, which has lactate as a precursor. This correlates well with the production of lactate from these substrates. NMR analyses also allow for the determination of  $^{13}\text{C}$ -labeled metabolites other than SCFA. These include lactate, glycerol, ethanol and some amino acids. The data have been integrated in a metabolic flux model for the human microbiota, predicting fermentation by *in silico* modeling. A pilot *in vivo* trial shows that fermentation of the substrate in the human colon can be evidenced as well.

The use of stable isotope ( $^{13}\text{C}$ )-labeled substrates, in combination with the tools developed, aid significantly in the understanding of the ecology of the colonic microbiota. It allows one to precisely determine which microbes are involved in the food-chain of fermentation of a certain substrate, as well as the exact determination of the microbial metabolites that are produced from it. In addition, it also allows for the determination of the energy harvested from these substrates (in kcal/g), linking fermentation to the role of the colonic microbiota in obesity. Moreover, it opens the way to develop specific substrates that are fermented only by the bugs of choice. The tools for implementation in human clinical trials have been developed as well, allowing use of the tools in human volunteers.

#### **A079 RAPID AND COST-SAVING METHODS FOR THE STUDY OF LEVANSUCRASES, PRODUCERS OF POTENTIALLY PREBIOTIC OLIGO- AND POLYSACCHARIDES**

T. Visnapuu, E. Jõgi, K. Mardo, M. Gromkova, T. Alamäe  
*Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu, Estonia*

**Introduction.** Many plant-pathogenic bacteria, but also some probiotic lactic acid bacteria possess levansucrases that synthesize from sucrose  $\beta$ -2,6 linked fructans, fructooligosaccharides (FOS) and levan. While  $\beta$ -2,1 linked FOS are well-known prebiotics, health effects of  $\beta$ -2,6 linked FOS are poorly studied as they are not commercially available. Levansucrase Lsc3 of *Pseudomonas syringae* pv. tomato has high potential for enzymatic synthesis of FOS and levan for their prebiotic efficiency studies [-3]. We will evaluate rapid methods used by us in levansucrase assay by testing them on a panel of levansucrase variants - wild-type Lsc3 protein and its mutants.

**Materials and methods.** Heterologously expressed and purified His-tagged levansucrase variants were studied for 1) sucrose-splitting activity, 2) FOS production, 3) ability and kinetics of levan synthesis, 4) thermostability in a Thermofluor assay. In most cases, microplate-based approach was used. Some assays used permeabilized *E. coli* cells expressing a levansucrase protein as a catalyst. HPLC was used for quantification of glucose, fructose, sucrose and FOS in reaction mixtures.

**Results.** Catalytic properties of levansucrase variants were characterized using a battery of high-throughput methods. Data obtained with traditional assay methods were

used for comparison. Importantly, we show that sucrose-splitting activity of levansucrases as well as their ability to produce FOS can be evaluated on permeabilized levansucrase-expressing *E. coli*.

**Conclusion.** High-throughput methods elaborated by us are feasible for preliminary characterization of levansucrases and their mutant variants. Economical methods that will be presented should be applicable not only in levansucrase assay, but also for high-throughput (automated) study of other enzymes.

**Financing:** Project Functional Food Ingredients (3.2.0701.12-0041; SLOMR12215T) managed by Archimedes Foundation and ESF grant GLOMR9072.

#### **A080 COMPLETE SUPPRESSION OF THE GUT MICROBIOME PREVENTS ACUTE GRAFT-VERSUS-HOST-DISEASE AFTER ALLOGENEIC BONE MARROW TRANSPLANTATION, PROVING THEIR DIRECT CONNECTION IN A CLINICAL STUDY**

J.M. Vossen<sup>1</sup>, A.C. Lankester<sup>1</sup>, A.C.T.M. Vossen<sup>2</sup>, R.G.M. Bredius<sup>1</sup>, R. Wolterbeek<sup>3</sup>, J.D.J. Bakker<sup>1</sup>, P.J. Heidt<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Paediatrics

<sup>2</sup>Department of Medical Microbiology

<sup>3</sup>Department of Medical Statistics and Bioinformatics, Leiden University Medical Centre, Leiden, The Netherlands

<sup>4</sup>Biomedical Primate Research Centre, Rijswijk, The Netherlands

The hypothesis that elimination of facultative and strict anaerobic microorganisms from the gastro-intestinal tract by antimicrobial drugs in the period of time around allogeneic BMT prevents acute GVHD, was examined in a cohort of 137 children grafted between 1989 and 2002 for haematological malignancies. All patients received T-cell replete marrow from HLA matched donors under identical transplantation conditions. They were given high doses of non-absorbable antimicrobial drugs (total gastro-intestinal decontamination) while maintained in strict protective isolation. About half of the children (49%) proved to be successfully decontaminated, and about half (51%) unsuccessfully; 4 children got acute GVHD in the first group and 12 in the second group ( $p < 0.05$ ). Successful total gastro-intestinal decontamination was superior to other risk factors for acute GVHD such as higher age, sex-mismatch and carriership or reactivation of herpesviruses. Our results prove that successful total gastro-intestinal decontamination of graft recipients prevents acute GVHD. We suppose that massive translocation of gastro-intestinal microorganisms or parts of these, functioning as MAMP's (microbial-associated molecular patterns), triggering macrophages/dendritic cells via PRR's (pattern recognizing receptors) is excluded following suppression of the gut microbiome. As a consequence the initiation of an inflammatory and T-cell mediated reaction leading to GVHD is blocked.

#### **A081 EXPRESSION OF TLR-2 AND TLR-4 BY MUCOSAL EPITHELIAL CELLS AFTER EXPOSITION WITH METABOLITES OF CANDIDA AND BACTERIAL REPRESENTATIVES OF HUMAN MICROBIOTA**

M.I. Zaslavskaya, O.A. Lukova, N.A. Alexandrova, V.S. Kropotov

*Nizhny Novgorod Medical State Academy, Nizhny Novgorod, Russia*

Representatives of human normal microbiota may have different pathogenic potential in the direction of mucosal membranes. It was investigated the ability of

fungal and bacterial human microbiota to regulate of the Toll-like receptor expression in mucosal epithelial cells.

*Candida albicans*, *Candida crusei* and *Candida glabrata* were cultivated on Sabouraud liquid media. *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* and *Escherichia coli* were cultivated on a peptone broth. Supernatants with microbial metabolites were separated (2000g, 15 min) from fungal or bacterial broth cultures (24 h, 37°C). Human buccal epithelial cells from healthy volunteers were washed (40g, 5 min) and suspended in physiological buffer solution (PBS, pH 7.2-7.4). Epithelial cells (separated into several groups) were treated by fungal or bacterial supernatants (30 min, 37°C). Non-treated mucosal cells were used as control. Then we added antibody cocktail (CD282, CD284, 5µl, BD Pharmingen) for identification TLR-2 and TLR-4 to 100 µl buccal cells (10<sup>6</sup> cell/ml). The analysis of TLR-2 and TLR-4 mucosal cell expression has been executed by Flow Cytometer (BD FACS Canto II System).

Metabolites of different candida species are always increase TLR-2 expression on the surface of vital epithelial cells. So, quantity of TLR-2 receptors is increased in 1,3; 1,6 and 1,5 times (p<0.05) after incubation of buccal cells with *C. albicans*, *C. crusei* and *C. glabrata* supernatants accordingly. On the contrary, contact of epithelial cells with metabolites of *S. aureus*, *E. faecialis* and *E. coli* essentially reduce (in 2,4; 10; 3,6 times accordingly; p<0.05) production of TLR-2 molecules. At the same time, candida metabolites did not change of TCR-4 expression of buccal cells whereas *S. aureus*, *E. faecialis* and *E. coli* supernatants are decrease it concentration (in 1,4; 1,2 and 4 times accordingly; p<0.05). Thus, fungal and bacterial human microbiota are able to use the different pathways for modification expression of Toll-like receptors and regulation of mucosal immunity.

#### **A082 VOLATILE FATTY ACIDS AS MICROBIAL MODULATORS OF THE ACTIVITY OF THE NERVOUS SYSTEM**

**O.G. Zhilenkova**

*Gabrichesky Institute of Epidemiology & Microbiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia*

Volatile fatty acids (VFAs) belong to the most important low molecular weight compounds formed by representatives of the intestinal microbiota; they have various targets in the cells and organs of the gastro-intestinal (GI) tract as well as in a number of other systems of the human organism. Since 60% of patients with GI diseases develop neurological and mental disorders, many researchers believe that these disorders are due to the modifying effect of VFAs on the cells of the central and the peripheral nervous system. According to the data available in the literature, it is mainly butyric and propionic acid derivatives that regulate energetic homeostasis via the specific receptors of ganglial nervous cells. Some VFAs modify the synthesis of neuroactive compounds such as serotonin, 5-aminovaleic acid, γ-aminobutyric acid (GABA), hydroxybutyric acid, and a number of

neuromediator amino acids. Only scarce data are currently available concerning the microbiota's capacity to produce g-hydroxybutyric acid (GHBA). GHBA reveals much similarity to GABA, the neuromediator involved in inhibiting the activity of the CNS, activating energy transduction in the brain, and stimulating blood circulation and the respiratory activity of the nervous tissue and other cell groups. GHBA is a natural metabolite of all mammalian cells; its function is closely related to GABA metabolism. Unlike GABA, GHBA easily passes through the blood-brain barrier, which accounts for its high concentrations in the hypothalamus of both embryos and adult individuals. GHBA produces antihypoxic, sedative, and centrally mediated muscle-relaxing effects. It significantly increases the level of dopamine, while only inconsiderably changing the concentrations of other catecholamines; therefore, the solution of the sodium salt of GHBA is applied in anaesthesiology. Recently, GHBA and a large number of its derivatives have been widely used by drug addicts to optimize the duration of the effects of ecstasy-like stimulants and of many pain killers (opiates and opioids). Since GHBA is metabolized via the Krebs cycle that is common to pro- and eukaryotic cells, we cannot rule out the option that intestinal microorganisms are both consumers and producers of both GABA and GHBA.

In this presentation, new data concerning the methods of determining GHBA in the culture fluids of opportunistic and probiotic bacteria will be reported.

#### **A083 T-LIKE BACTERIOPHAGE WITH LYTIC ACTIVITY ON PATHOGENIC AND CEPHALOSPORIN RESISTANT *ESCHERICHIA COLI* FROM CHICKEN**

**A.A. Kaikabo<sup>1,3</sup>, S.M. Abdulkarim<sup>1\*</sup>, F. Abas<sup>1</sup>, C.C. Sieo<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Department of Food Science, Faculty of Food Science and Technology, University Putra Malaysia, 43300 UPM Serdang, Selangor, Malaysia*

<sup>2</sup>*Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Biomolecular Sciences, University Putra Malaysia, 43300 UPM Serdang, Selangor, Malaysia*

<sup>3</sup>*Bacterial Research Department, National Veterinary Research Institute, PMB 01 Vom 930010, Plateau State, Nigeria*

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC 01) cause colibacillosis in chicken and have been implicated in urinary tract infection and neonatal meningitis in human. Similarly, extended spectrum beta lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* has been isolated from cases of colibacillosis and airsacculitis in poultry. Chicken has been incriminated as a reservoir for ESBL *Escherichia coli* producing extended spectrum beta lactamases, which is an important cause of treatment failure with cephalosporin in clinical setting. The route of transmission of these pathogens to human is through the food chain or contaminated environment. We have isolated and identified a T-like bacteriophage that infects APEC 01 and ESBL-*Escherichia coli* strains from chicken; this could be a useful biocontrol tool in poultry that would reduce human infections with these pathogens and treatment failures with cephalosporin in clinical setting.

## **Т001 СТРУКТУРА И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ПЕПТИДОГЛИКАНГИДРОЛАЗ СТАФИЛОКОККОВЫХ БАКТЕРИОФАГОВ В *ESCHERICHIA COLI***

**И.В. Абаев, Ю.П. Скрыбин, О.В. Коробова,  
Н.А. Шишкова, Э.А. Светоч**

*ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии,  
Оболensk, Россия*

*Staphylococcus aureus* известен своей способностью эффективно формировать устойчивость практически ко всем антибиотикам, применяемым в клинике. В этой связи представляет интерес разработка нового поколения антистафилококковых препаратов на основе пептидогликангидролаз бактериофагов (ПГФ), способных вызывать гибель метициллин-резистентных штаммов *S. aureus* с множественной лекарственной устойчивостью. При литическом цикле развития бактериофага ПГФ обеспечивают освобождение сформировавшихся вирионов из клетки, гидролизуя пептидогликан, основной структурный компонент клеточной стенки бактерий. ПГФ обладают целым рядом свойств, выгодно отличающих их от антибиотиков, и, в частности, способностью разрушать клетки *S. aureus* как в планктонной форме, так и в состоянии биопленки. Целью исследования было сравнительное изучение антимикробной активности делеционных вариантов стафилококковых ПГФ различных типов. На основе нуклеотидной гомологии было выделено семь специфических типов гомологии генов стафилококковых ПГФ. Специфические типы генов стафилококковых ПГФ могут также различаться по модульной структуре гена и по числу каталитических доменов. Из каждой группы гомологии клонировали по одному гену ПГФ и изучали сравнительную антистафилококковую активность каталитических доменов ПГФ. Для этого получили делеционные конструкции каждого домена, экспрессировали конструкции в *E. coli* и анализировали очищенные белки в отношении антимикробного потенциала. Таким образом, были сконструированы рекомбинантные белки, состоящие из одиночных каталитических доменов цистеин-гистидин-зависимой амидогидролазы (СНАР), М23 пептидазы и 2 N-ацетилмурамоил-L-аланин амидазы. Сравнивали зависимость антистафилококковой активности конструкций от наличия С-концевого SH3b связывающего домена. Показаны различия в антимикробной активности конструкций, несущих одиночные СНАР домены различных групп гомологии. Полученные данные полезны для разработки новых рекомбинантных белков с повышенной антистафилококковой активностью на основе комбинации доменов из различных нативных ПГФ.

## **Т002 ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К БАКТЕРИОФАГАМ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА**

**Н.В. Алексанина**

*ФБУН РНИИМП, Ростов-на-Дону, Россия*

Экологическое неблагополучие страны, возрастание стрессорных воздействий, повышенный радиационный фон, неполноценность питания, массовое бесконтрольное применение антибиотиков и химиотерапевтических препаратов приводит к увеличению числа детей с нарушениями микробиоценоза кишечника, выявляемыми уже в раннем детском

возрасте. У большого процента детей с нарушениями микробиоценоза выделяются из кишечника условно-патогенные энтеробактерии (гемолизирующие и лактозонегативные эшерихии, клебсиеллы, протеи, патогенные стафилококки, синегнойные палочки) в монокультурах или в ассоциациях, в количествах превышающих допустимые нормы. Продукты метаболизма этих микроорганизмов вызывают воспалительный процесс в кишечнике, алергизацию организма детей, инициируют и поддерживают дисбиотические состояния. Дети с нарушениями микробиоценоза представляют группы риска по соматической и инфекционной заболеваемости, в том числе острыми кишечными инфекциями.

Одним из свойств условно-патогенных энтеробактерий является быстрая выработка устойчивости к антибактериальным средствам, уже на этапе первой линии антимикробной терапии, что затрудняет лечение и профилактику этих нарушений.

В настоящее время в связи с широким распространением лекарственно устойчивых форм бактерий, в детской гастроэнтерологии для антибактериальной терапии используют бактериофаги. Одним из важных свойств бактериофагов является их специфичность, сочетание с любыми лекарственными препаратами, отсутствие негативного воздействия на нормальную микрофлору кишечника. Необходимым условием эффективной фаготерапии является предварительное определение фагочувствительности возбудителей заболевания.

Все вышеизложенное делает актуальным и целесообразным постоянное слежение за изменением антибиотико- и фагорезистентности условно-патогенных энтеробактерий, выделяемых из микробиоценоза детей раннего возраста групп риска.

В данной работе изучена чувствительность условно-патогенных энтеробактерий родов *Klebsiella*, *Proteus*, неферментирующих микроорганизмов рода *Pseudomonas* и стафилококков, выделенных от детей раннего возраста, к выпускаемым в нашей стране коммерческим препаратам бактериофагов.

Материалы и методы исследования. В исследование были включены 419 штаммов условно-патогенных энтеробактерий, выделенных от детей (70 штаммов – *K. pneumoniae*, 95 штаммов – бактерий рода *Proteus*, 95 штаммов – непатогенных стафилококков, 103 штамма *Staph. aureus*, 56 штаммов – *P. aeruginosa*).

Для работы использовали моно и поливалентные препараты бактериофагов (жидкие): колипротейный бактериофаг (г. Уфа), бактериофаг стафилококковый (г. Н.Новгород), бактериофаг псевдомонас аэругиноза (синегнойный) (г. Н.Новгород), бактериофаг клебсиелл пневмония (очищенный) (г. Уфа), Секстафаг пиобактериофаг поливалентный (г. Пермь), Пиополифаг (пиобактериофаг комбинированный жидкий) (г. Уфа).

Определение чувствительности бактерий к препаратам бактериофагов проводили путем нанесения капли препарата (0,01 мл) на газон – test штамм («Spot-test»). Учет степени лизиса бактерий регистрировали по четырех крестовой схеме. Оценивали чувствительность энтеробактерий к фагам следующим образом: высокая (на 3–4 креста) чувствительность – полный лизис или незначительный вторичный рост, низкая (на 2–1) чувствительность – полусливной рост, до 50–10 колоний фага, отрицательный – отсутствие лизиса



Результаты исследований и их обсуждение. При проведении исследования нами было выделено от детей 419 штаммов условно-патогенных микроорганизмов родов *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* (70 штаммов *K. pneumoniae*, 95 штаммов *Proteus*, 103 штамма *Staph. aureus*, 95 штаммов непатогенных стафилококков, 56 штаммов *P. aeruginosa*). Все культуры обладали высокой антибиотикорезистентностью. Определение чувствительности энтеробактерий к фагам проводили одновременно со всеми образцами моно и поливалентных (комбинированных) препаратов бактериофагов.

Наибольшую чувствительность к бактериофагам наблюдали у золотистого стафилококка (*Staph. aureus*). 74% штаммов были высокочувствительны к бактериофагам, лишь 26% обладали низкой чувствительностью или были резистентны к фагу. У представителей родов *Klebsiella* и *Proteus* количество высокочувствительных штаммов было практически одинаковым и составило 36% и 37% соответственно, низкая чувствительность или устойчивость к бактериофагам – 63% и 64% соответственно. У синегнойной палочки (*P. aeruginosa*) высокой чувствительностью обладали 57% штаммов и 43% штаммов проявляли низкую чувствительность или устойчивость к препаратам бактериофагов. У непатогенных стафилококков выявлена самая высокая резистентность к бактериофагам, которая составила 75,8% (8,4% – низкая чувствительность, 67,4% – устойчивы к фагу), лишь 24,2% штаммов были высокочувствительны к бактериофагам.

Высокая степень чувствительности к препаратам бактериофагов для всех изученных культур колебалась от 24,2% до 74%, низкая – от 8,4% до 17%. Резистентность условно-патогенных энтеробактерий, выделенных от детей колебалась от 12% до 67,4%.

Следует отметить, что чувствительность изученных микроорганизмов была одинаковой как к моно, так и к поливалентным препаратам бактериофагов, взятых для проведения исследований.

Заключение. Проведенные исследования показали, что условно-патогенные микроорганизмы, выделенные от детей раннего возраста, характеризуются разной степенью чувствительности к бактериофагам.

Высокая степень чувствительности к бактериофагам выявлена 191 (46%) культур, у 54 (13%) культур она была низкой, 174 (41%) культур были резистентны к взятым для исследования препаратам бактериофагов.

### Т003 БИОДЕКОНТАМИНАЦИЯ ПИЩЕВЫХ ПОЛУФАБРИКАТОВ С ПОМОЩЬЮ БАКТЕРИОФАГОВ

В.А. Алешкин, Ю.В. Ларина, И.А. Киселева,  
С.С. Афанасьев, А.В. Алешкин

ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия

Появление новых технологий переработки полуфабрикатов, длительная транспортировка и нарушение санитарных правил на производстве, увеличивают возможность накопления в продуктах возбудителей кишечных инфекций. Применение дезинфектантов не решает эту проблему, снижая уровень экологической чистоты продукции и провоцируя появление резистентных к антибиотикам штаммов бактерий. В МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского проводятся исследования по созданию средств

фаг-опосредованного биопроцессинга мяса, молока, птицы и рыбы для их деконтаминации в процессе переработки перед герметичной упаковкой полуфабрикатов. Первым в серии продуктов было разработано вспомогательное технологическое средство на основе фага EcD7, активного в отношении STEC штаммов O104:H4, O157:H7 и клинически значимых *E. coli* других серогрупп, предназначенное для деконтаминации говяжьего фарша. Полногеномное секвенирование и биоинформационный анализ EcD7 подтвердили его вирулентную природу и отличия от ранее известных Т-подобных миовирусов. Фаг-опосредованный биопроцессинг с помощью EcD7, смоделированный в лабораторных условиях, привел к элиминированию *E. coli* в говяжем фарше в течение 24 часов. Для деконтаминации куриного окорока разработано вспомогательное технологическое средство на основе сальмонеллезного бактериофага SE 42, проявляющего специфическую литическую активность в отношении *S. enteritidis*. При использовании бактериофага SE 42 полная элиминация сальмонелл с поверхности обработанных фагом кусочков окорока наблюдалась в интервале от 1 до 24 часов от начала деконтаминации в зависимости от титра фага. Для использования в молочной промышленности разработано вспомогательное технологическое средство на основе двух оригинальных вирулентных фагов, лизирующих MRSA-штаммы и шига-токсин-продуцирующие *E. coli*. Фаг-опосредованный биопроцессинг с помощью этих штаммов, позволил достичь более чем 99% элиминации пищевых патогенов в течение 2 часов. Проведенные исследования подтверждают возможность эрадикации пищевых бактериальных патогенов, контаминирующих полуфабрикаты, в течение 2 часов при соотношении количества фаговых частиц к бактериальным клеткам (множественность инфицирования – МИ) не менее 100:1 и через 24 часа при МИ равном 1:1. Использование нового метода деконтаминации пищевых полуфабрикатов – фаг-опосредованного биопроцессинга – полностью сохраняет пищевую ценность и вкусовые качества продуктов.

### Т004 ФАГОПРОФИЛАКТИКА «ДИАРЕИ ПУТЕШЕСТВЕННИКОВ»

А.В. Алешкин<sup>1,2</sup>, Е.О. Рубальский<sup>1,2</sup>, И.А. Киселева<sup>1,2</sup>,  
С.С. Бочкарева<sup>1,2</sup>, О.Ю. Борисова<sup>1,2</sup>, С.С. Афанасьев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ООО «БиФаг», Москва, Россия

<sup>2</sup>ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,  
Москва, Россия

Более 60% случаев «диареи путешественников» (ДП) диагностируются как бактериальные инфекции, основной причиной которых выступает *E. coli* (включая веротоксин-продуцирующие штаммы – VTEC). Пробиотики широко используются в качестве безопасного и эффективного средства предупреждения ДП. Нами разработан специализированный продукт профилактического (диетического) питания, относящийся к новому классу средств предупреждения ДП – фагобиотикам, содержащий бактериофаги лизирующие *E. coli*, *Sh. flexneri*, *Sh. Sonnei*, *S. enterica*, *L. monocytogenes* или *S. aureus*. В эксперименте на животных и добровольцах проведена оценка его эффективности против инфекции, вызванной непатогенным лактозонегативным штаммом *E. coli* K12 С600. Экспериментальная инфекция у мышей (16-18 г) опытной (20 штук) и контрольной (20 штук)

групп была вызвана пероральным введением 0,5 мл *E. coli* K12 С600 ( $5 \times 10^7$  КОЕ/мл) в течение 3 дней (2–4 день исследования). Мыши опытной группы получали фагобиотик внутрижелудочно в течение 5 дней (1–5 день исследования), представителям контрольной группы вводили по 0,5 мл PBS по той же схеме. В пилотном клиническом исследовании участвовало 10 добровольцев – здоровых лиц в возрасте 24–46 лет. Они принимали перорально по 20 мл *E. coli* K12 С600 в том же титре в течение 3 дней (2–4 день). Пять лиц опытной группы получали по 50 мл фагобиотика дважды в день в течение 5 дней (1–5 день), 5 добровольцев контрольной группы принимали PBS по той же схеме. До начала исследования в образцах кала участников обоих экспериментов с использованием микробиологического метода и ПЦР к специфической для *E. coli* K12 С600 последовательности *orf264* искомой Лас (-) *E. coli* обнаружено не было. На 6-й день исследования штамм *E. coli* K12 С600 обнаруживался в контрольных группах: до 3-го разведения в фекалиях мышей ( $10^4$  КОЕ/г) и до 5-го ( $10^6$  КОЕ/г) – в кале добровольцев, в образцах опытных групп данный штамм не обнаруживался. При этом колифаги, входящие в состав фагобиотика, определялись в 100% проб опытных групп на 6-й день и в 20% – на 7-й день испытаний. В ходе экспериментов подтверждена эффективность использования фагобиотика для профилактики инфекции, вызванной непатогенной *E. coli*. Полученные результаты имеют высокую клиническую значимость, так как спектр литической активности оригинальных колифагов в составе фагобиотика покрывает VТЕС-штаммы O104:H4 и O157:H7, вызывающие тяжелые случаи ДП.

#### Т005 БАКТЕРИОФАГИ В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА

А.В. Алешкин<sup>1,2</sup>, Е.О. Рубальский<sup>1,2</sup>, А.В. Попова<sup>1,3</sup>,  
В.И. Евстигнеев<sup>4</sup>, С.Ю. Пчелинцев<sup>5</sup>, С.С. Афанасьев<sup>2</sup>,  
Э.А. Светоч<sup>3</sup>, Н.В. Воложанцев<sup>3</sup>, В.В. Веревкин<sup>3</sup>,  
И.А. Киселева<sup>1,2</sup>, С.С. Бочкарева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ООО «БиФаг», Москва, Россия

<sup>2</sup>ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

<sup>3</sup>ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Оболensk, Россия

<sup>4</sup>ОАО «Биопрепарат», Москва, Россия

<sup>5</sup>ОАО «Институт инженерной иммунологии», Любучаны, Россия

Различные факторы космического полета, гиподинамия, стресс, особенности питания, ограниченность и специфичность микрофлоры на МКС вызывают дисбиотические нарушения ЖКТ, которые могут провоцировать развитие тяжелых патологических состояний у космонавтов, усугубляющихся повышением вирулентности и формированием резистентности к антибиотикам патогенных и условно-патогенных бактерий. Нами разработан новый класс пробиотиков – фагобиотики, который может использоваться для поддержания нормоценоза у космонавтов. Изучение влияния факторов космического полета на жидкие и лиофилизированные формы бактериофагов проводится в рамках долгосрочной программы научно-прикладных исследований и экспериментов, планируемых на РС МКС, и космического эксперимента «Бактериофаг». Лيوфилизированные культуры бактериофагов *S. aureus*, *S. pyogenes* и *P. aeruginosa*, сухая и жидкая формы специализированного продукта профилак-

тического питания «ФудФаг» (коктейль из 7 фагов: *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *E. coli* O157, *E. coli* O104, *S. aureus*, *L. monocytogenes*) были отправлены на МКС на 1,5 и 3 месяца. Сравнивали фенотипические свойства (спектр литической активности, титр, морфологию бляшек и устойчивость фагов к повышенной температуре и изменениям pH) и проводили полногеномное секвенирование фагов на секвенаторе IonTorrent PGM до, после 1,5 и 3 месяцев пребывания на МКС. Титр бактериофагов, входящих в состав «ФудФага», в жидкой и лиофилизированной форме снижался на один порядок после 1,5 месяцев хранения, в то время как после 3-месячного хранения на МКС титр лиофилизированной формы падал на 2 порядка, жидкой – на один. Титр бактериофагов *S. aureus*, *S. pyogenes* и *P. aeruginosa* также уменьшался на 2 порядка после 3-месячного хранения на МКС. Фенотипические свойства у всех штаммов бактериофагов в жидкой и лиофилизированной формах после 1,5 и 3-месячного хранения на МКС оставались неизменными. Кроме того, мы не обнаружили вставок, делеций или нуклеотидных замен в ДНК бактериофагов после их возвращения с МКС. Таким образом, на исследованные сроки, нами отмечена большая стабильность титра жидкой формы при хранении на МКС. Полученные результаты открывают возможность безопасного и эффективного использования бактериофагов для нормализации дисбиотических состояний у космонавтов в условиях МКС. В последующих исследованиях планируется увеличение срока пребывания фагов в космосе до года.

#### Т006 СОЧЕТАННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ С ЛАКТОГЛОБУЛИНОМ ДЛЯ САНАЦИИ СЕМЕЙНЫХ ОЧАГОВ

А.В. Алешукина, Е.В. Голошва, Э.А. Яговкин,  
И.С. Алешукина

ФБУН «Ростов НИИ микробиологии и паразитологии»  
Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Амбулаторно было обследовано 206 пар кормящая мать + ребенок в возрасте от 1 мес. до 12 мес. Изучали дисбиоз кишечника детей в соответствии с ОСТ 2003. У матерей проверяли грудное молоко на стерильность. У изолятов *Staphylococcus sp.* определяли чувствительность к антибиотикам и бактериофагам. Проведена масс-спектрометрия культур (Bruker Daltonik MALDI Biotyper).

Дети были рандомизированы на группы: 1-я группа – проводили курс лактоглобулина и бифидобактерий (24 чел.); 2-я – курс бактериофагов и бифидобактерий (41). 3-я – курс последовательно лактоглобулин, бактериофаги и бифидобактерии (70). 4-я – лактоглобулин, бактериофаги, затем лактобациллы и бифидобактерии (71). Матери с инфицированным молоком получали коррекцию бактериофагами, препаратами лизоцима и лактоглобулином.

Было обнаружено, что у детей в 85% выявлялись: *Staphylococcus aureus* (81%); *S. intermedius* (4%); *S. capitis* (5%), *S. hominis* (4%), *S. epidermidis* (3%), *S. cohnii* (3%) в количестве  $lg 4-7$  КОЕ/г. Выявление стафилококков у детей сопровождалось снижением содержания лакто- и бифидобактерий (44% и 96% соответственно). В ассоциации со стафилококками встречались *Klebsiella pneumoniae* (17,8%); *Proteus sp.* (10,9%); *Pseudomonas aeruginosa* (1,4%). У матерей в молоке па-

тогенные стафилококки обнаруживались в 83,6% (до 10<sup>6</sup> КОЕ/мл). В 16,4% случаев молоко было стерильным. Преобладали гемолитические *S. epidermidis* (75,3%), а *S. aureus* составляли 8,3%. В 100% случаев *S. aureus* и *S. epidermidis* относились к оксациллин-резистентным. Одновременно выделение *S. aureus* у матери и ребенка составляло 18,4%. Выявление в парах *S. epidermidis* отмечено в 40,4%. Эффективность коррекции состава микрофлоры в кишечнике одновременно лактоглобулином и бактериофагами была достоверно выше, чем в случаях использования препаратов в моновариантах.

Таким образом, у детей и кормящих матерей зафиксировано выделение патогенных стафилококков, характеризующихся полиантибиотико-резистентностью, которая диктует необходимость проведения комплексного обследования и одновременного лечения кормящей матери и грудного ребенка с сохранением возможности продолжения естественного вскармливания. Назначение лактоглобулина в комплексе с бактериофагами способствует профилактике и лечению латентной стафилококковой инфекции у детей раннего возраста и приводят к санации семейного очага.

#### **T007 ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ КАРТОФЕЛЯ С СИМПТОМАМИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ**

**Е.Н. Андрийчук**

*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,  
Киев, Украина*

*Erwinia carotovora* вызывает болезни картофеля и других растений, называемые чёрная ножка и мягкая гниль. Бактерии поражают как надземные части растения, так и подземные, в том числе и клубни, вызывая потемнение и гниение тканей, скручивание и пожелтение листьев.

Бактериофаги фитопатогенных бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, по сравнению с таковыми энтеробактерий, ассоциированных с животными и человеком, изучены недостаточно. Интерес вызывают бактериофаги, которые способны преодолевать межвидовые барьеры и вызывать инфекционный процесс у филогенетически отдаленных бактерий.

Целью работы было выделение из растительного материала с симптомами бактериального поражения фагов к *Erwinia carotovora st.216/IMV* и их анализ.

Изучали особенности фагов фитопатогенных бактерий, которые относятся к семейству *Erwinia*. При посеве фагов методом двухслойного агара на чувствительной культуре было получено негативные колонии, которые имели четкие контуры, были прозрачными, размером около 1 мкм. Для фагов 216 – Д1 и 216 – Д2 проводили электрофорез белков по Леммли. Были рассчитаны их молекулярные массы. Для фага 216 – Д2 выявлены белки с молекулярной массой от 21,3 кДа до 53,3 кДа. Для фага 216 – Д1 диапазон составлял от 8,2 кДа до 58,5 кДа. Анализ белкового состава фагов позволил выявить 11 полипептидов в 216 – Д2, в 216 – Д1 выявлено 21 полипептид. Проведена сравнительная характеристика геномов фагов с помощью рестрикционного анализа. Чувствительность к специфическим эндонуклеазам HindIII, EcoRV показывает, что исследуемые фаги содержат двухцепочечную ДНК. Рестрикционный анализ ДНК фагов, обработанных ферментом

HindIII показал, что фаги имели подобный профиль рестрикции, они делились ферментом 5 фрагментов с суммарной длиной 59,4 кВ и 57,4 кВ соответственно. При обработке ДНК фагов 216 – Д1, 216 – Д2 рестриктазой EcoRV наблюдали идентичные профили рестрикции. Были установлены следующие количества фрагментов ДНК: для 216 – Д2 это 26 фрагментов с суммарной длиной 59,1 кВ, для 216 – Д1 также 26 фрагментов с похожими показателями суммарной длины – 58,6 кВ.

Полученные результаты позволяют проанализировать особенности выделенных бактериофагов для проведения оценки патогенного процесса с участием *E. carotovora*.

#### **T008 АНТИМИКРОБНАЯ И ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ ИНДОЛИЦИДИНА**

**А.Ю. Артамонов<sup>1</sup>, Д.С. Орлов<sup>1,2</sup>, О.В. Шамова<sup>1,2</sup>,**

**Е.Г. Рыбакина<sup>1</sup>, Н.И. Колодкин<sup>3</sup>, М.П. Смирнова<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУ «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАМН,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный  
университет», Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>ФГУП «Гос. НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России,  
Санкт-Петербург, Россия

Решение проблемы устойчивости патогенных микроорганизмов к широко используемым типам противобактериальных лекарственных средств, согласно данным ВОЗ на 2014 год, поставлено на глобальном международном уровне. Практическое применение природных антимикробных пептидов (АМП) в качестве лекарственных средств ограничено их способностью повреждать клетки человека. Индолицидин (Ind) – катионный пептид, выделенный из лейкоцитов быка, является высокоактивным антимикробным агентом в отношении широкого спектра микроорганизмов, но также этот пептид разрушает эритроциты человека.

Целью работы было исследование биологической активности синтетических катионных пептидов Ind2, Ind7, Ind8, Ind20, Ind21 и Ind22, созданных на основе природного Ind и характеризующихся различным суммарным зарядом молекулы.

Антимикробную активность пептидов оценивали по минимальной ингибирующей концентрации (МИК), определяемой с помощью хромогенного маркера метаболической активности ресазурина и метода радиальной диффузии в геле.

Полученные данные об активности исследованных пептидов в отношении *E. coli* позволяют предположить, что с постепенным увеличением суммарного заряда молекулы пептида до определенного значения антимикробная активность синтетических пептидов возрастает. Изучение биологических свойств этих пептидов в отношении *L. Monocytogenes* и *S. aureus* свидетельствует, что существует также порог значения заряда, до достижения которого увеличение суммарного заряда молекулы пептида не усиливает их антимикробную активность.

При исследовании влияния синтетических пептидов Ind2, Ind7, Ind8, Ind20, Ind21 и Ind22 на гемолиз эритроцитов человека при помощи фотометрии показано, что все исследованные вещества, кроме

Ind2, обладают сниженной гемолитической активностью в сравнении с этим показателем у природного Ind. Для пептидов Ind7, Ind8, Ind20, Ind21 и Ind22 установлена закономерность, что количество разрушенных эритроцитов обратно пропорционально увеличению суммарного заряда молекулы пептида.

Получение структурных модификаций природных пептидов с оптимальными биологическими свойствами позволяет рассматривать их как перспективные антибиотические молекулы и открывает возможность разработки на их основе новых синтетических лекарственных препаратов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-02102а.

### **T009 ВЛИЯНИЕ ПИОБАКТЕРИОФАГА НА АДГЕЗИВНОСТЬ И ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ СТАФИЛОКОККА**

Г.Е. Афиногенов, А.Г. Афиногенова, Д.Ю. Мадай  
ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

**Цель.** Выявление способности пиобактериофага подавлять адгезивность и цитотоксичность золотистого стафилококка на клеточной модели.

**Материалы и методы.** Проводили определение бактериолитической активности лечебного поливалентного пиобактериофага (пиофага) в отношении референс-штамма *S. aureus* 209P Oxford на культуре клеток фибробластов легкого эмбриона человека. В пробирку Лейтона на покровное стекло с монослоем фибробластов помещали 1,8 мл пиофага и 0,2 мл суточной тест-культуры микроорганизма в дозе  $10^9$  КОЕ/мл для получения конечной концентрации штамма  $10^8$  КОЕ/мл (опытный инокулят). В качестве контрольного инокулята использовали смесь 1,8 мл питательной среды Игла с 0,2 мл суточной тест-культуры в той же дозе. Пробирки инкубировали 2 часа при 37°C, затем клетки монослоя отмывали от неприкрепившихся микроорганизмов 5-кратной сменой среды Игла, фиксировали 96% этиловым спиртом, окрашивали по Романовскому-Гимза и исследовали под микроскопом с видеоизображением (Leica, Германия). Изменение показателя адгезии тест-микроба выражали в процентах по сравнению с соответствующим контролем без пиофага, принимаемого за 100%. При этом в контроле и в опыте оценивали цитотоксическое действие (ЦТД) стафилококка по шкале FDA: 0 баллов – отсутствие цитотоксического действия, 1 балл – слабое токсическое действие (20–25% лизированных клеток), 2 балла – мягкое токсическое действие (50% гибели клеток), 3 балла – умеренное токсическое действие (70–75% клеточного монослоя содержат округлые и/или лизированные клетки), 4 балла – тяжелое токсическое действие (100% деструкция клеточного монослоя). В каждом опыте оценивали не менее 100 клеток. Согласно данной шкале тестируемые препараты отвечают требованиям безопасности, если во всех опытных лунках степень ЦТД не более 1 балла.

**Результаты и обсуждения.** В контрольных инокулятах наблюдали 100% адгезию тест-штамма *S. aureus*. Процент адгезии микроба в присутствии пиофага достоверно снизился относительно контроля на 92,5%. На культуре клеток в контроле показано цитотоксическое действие тест-культуры стафилококка на уровне 2 баллов. В опыте наблюдали отсутствие ЦТД стафилококка (0 баллов) после 2-х часовой совместной инкубации с пиофагом.

### **T010 РАЗВИТИЕ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ: ВЛИЯНИЕ ВНЕШНИХ И ВНУТРЕННИХ ФАКТОРОВ**

Г.С. Баласанянц

ФГБУЗ «СПБНИИФ» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Эпидемическая ситуация по туберкулезу носит стабильно улучшающийся характер. Однако, в нем происходят изменения, которые не всегда можно охарактеризовать как положительные. Современной особенностью МБТ является прогрессирование феномена лекарственной устойчивости. Длительное бесконтрольное использование противотуберкулезных препаратов привело к появлению лекарственно-устойчивых (ЛУ) форм МБТ с самого начала химиотерапии, а активация эпидемического процесса в 90-е гг. способствовала быстрому распространению ЛУ возбудителя. Недостаток лекарственных средств, назначение неполных схем лечения ускорили этот процесс. И уже с середины 90-х гг. вопрос лекарственной устойчивости МБТ стал приобретать популяционный характер. Расширение спектра микробиологических исследований, появление молекулярно-генетических технологий идентификации лекарственной устойчивости «открывает» для фтизиатров запасы ЛУ туберкулеза.

Еще одним важным компонентом популяции микроорганизма можно считать сведения о распространённости *M. tuberculosis* штамма Beijing на территории России. Если предположить, что МБТ семейства Beijing циркулируют на территории бывшего СССР хотя бы несколько десятилетий и сопоставить эти данные с исследованиями, указывающими на более быструю способность МБТ этой принадлежности к развитию лекарственной устойчивости, то становится понятным, что при появлении противотуберкулезных препаратов в нашей стране развитие лекарственной устойчивости МБТ было фактически предопределено.

Что касается восприимчивого населения, то последствия политических изменений начала 90-х гг. привели к появлению новых групп риска – мигрантов и лиц-БОМЖ, которые прочно заняли свои эпидемиологические ниши. Однако ведущую роль в изменении этой части эпидемического процесса продолжает играть нарастание эпидемии ВИЧ-инфекции в стране. ВИЧ-инфекция, точнее ее прогрессирование, – основная причина смерти больных туберкулезом: ВИЧ-инфекций в 4б, в и 5 стадиях делает практически невозможным эффективное лечение таких больных, т.к. у них развиваются генерализованные формы туберкулеза. Сложность их лечения обусловлена еще и тем, что у таких больных имеет место сочетание двух основных проблем фтизиатрии: кроме ВИЧ-инфекции они в 64%–72% случаев заражаются МЛУ МБТ.

### **T011 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ИЗГОТОВЛЕНИЯ И КОНТРОЛЯ ИНДИКАТОРНЫХ ФАГОВ PROVIDENCIA**

Н.Г. Барт, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев

ФГБОУ ВПО УГСХА им. П.А. Столыпина, Ульяновск, Россия

Представители рода *Providencia* широко распространены в природе, их выделяют из воды, почвы, фекалий и мочи животных и человека. Бактерии

рода *Providencia* способны вызывать у животных и людей самостоятельные или в ассоциации с другими микроорганизмами заболевания.

Исследуемые объекты: сточные воды, водопроводная вода, фекалии животных, комбикорм, патологический материал от больных и погибших животных.

Выделены новые штаммы бактериофагов, активные в отношении бактерий рода *Providencia*, изолированных из объектов ветеринарного надзора и патологического материала. Изучены основные биологические свойства выделенных бактериофагов.

Для разработки технологических параметров изготовления и контроля индикаторных бактериофагов *Providencia* использовали отобранные штаммы фагов F-87 УГСХА, F-67 УГСХА и индикаторные культуры *Providencia rettgeri* Н 87, *Providencia rettgeri* Н 67. Индикаторные бактериофаги *Providencia* изготавливали путем культивирования в питательном бульоне (рН 7,4–7,6) с индикаторными бактериальными культурами. Индикаторные культуры хранили на полужидком МПА (рН 7,2–7,4) с 0,3% агара при температуре 2–4С и пересевали каждые 2–3 месяца.

Индикаторные бактериофаги F-87 УГСХА и F-67 УГСХА представляют собой прозрачную жидкость желтоватого цвета (цвет засеянной среды), без посторонних примесей, осадка и имеют титр не ниже  $10^8$ .

По результатам изученных биологических свойств выделенных бактериофагов установлено, что бактериофаги F-87 УГСХА и F-67 УГСХА являются строго специфичными в отношении бактерий рода *Providencia*, с широким совместным диапазоном литического действия – 96,4%, с литической активностью от  $4,2 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$  до  $1,8 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$  фаговых корпускул в 1 мл, оказались устойчивы к воздействию хлороформа – 100 % и обладали более высоким порогом термоинактивации, чем у бактерий (81°C). Эти показатели биологических свойств соответствуют требованиям, предъявляемым к производственным штаммам фагов, поэтому мы их использовали для конструирования диагностического биопрепарата.

## Т012 ИНТЕГРАЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА ЧЕЛОВЕКА И ЕГО МИКРОБИОТЫ

Н.В. Белобородова<sup>1</sup>, В.В. Мороз<sup>1</sup>, А.Ю. Бедова<sup>1</sup>, А.А. Осипов<sup>1</sup>, Е.А. Черневская<sup>1</sup>, И.Б. Дмитриева<sup>1</sup>, Н.И. Федотчева<sup>2</sup>, А.И. Ревельский<sup>3</sup>, А.Ю. Оленин<sup>3</sup>

<sup>1</sup>НИИ Общей реаниматологии им.В.А.Неговского РАМН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики, Пущино, Россия

<sup>3</sup>МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия

Изучение явления интеграции метаболизма человека и его микробиоты требует проведения научных исследований междисциплинарного характера. Сформирована научная группа, включающая врачей, клинических микробиологов, специалистов в области, биохимии, биофизики, хроматомасс-спектрометрии (ГХ-МС). Главная задача исследований – выявить ключевые метаболиты, влияющие на регуляцию гомеостаза в организме человека, способствующие развитию грубых метаболических и гемодинамических расстройств, органной недостаточности, то есть участвующие в танатогенезе.

В организме критически-тяжелого больного направленность действия «метаболического реактора»

микробиоты радикально изменена, обеспечивая выживаемость микробиоты – за счет организма хозяина. Важно подчеркнуть, что, по нашим данным, поломка физиологических механизмов интеграции и развитие своеобразного «противостояния» в критических условиях носит универсальный характер, независимо от первопричины заболевания или травмы. Учитывая, что геном человека обладает более ограниченными метаболическими возможностями по сравнению с микробиомом, наши исследования проводятся по принципу «от человека – к микробиоте», поэтому в центре внимания – группа микробных экзометаболитов, профиль которых значительно нарушен в крови тяжелых больных.

С применением метаболомного анализа на основе ГХ-МС [*Microbial Ecology in Health and Diseases, 2000, 12; Biochemistry 2009, 74, 12*] нами выявлена наиболее перспективная группа низкомолекулярных соединений – ароматические метаболиты (АМ), представляющие собой фенольные и фенилкарбоновые кислоты (ФКК), продукты биodeградации ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина, триптофана), полифенолов и др. На сегодняшний день нами детально изучены метаболические профили АМ в крови людей с различными заболеваниями, включая терминальные состояния.

Показано, что у здоровых людей суммарный уровень этих метаболитов в крови поддерживается на постоянном уровне, не превышая 6–10 мкмоль/л, в то время как у критических больных многократно возрастает с изменением профиля АМ. В микробиологических экспериментах нами показана способность основных видов анаэробных и аэробных бактерий из состава микробиоты человека в разной степени продуцировать или утилизировать эти соединения [*Общая реаниматология, 2012, VIII, 4*], в норме обеспечивая гомеостаз. В экспериментах на фагоцитах, на митохондриях и др. [Биологические мембраны, 2010, 27, 1] нами продемонстрированы неблагоприятные патологические эффекты воздействия повышенных доз АМ. Изучение клинической и патогенетической значимости нарушения интеграции метаболизма человека и микробиоты служит основанием для поиска новых решений в лечении больных, направленных на достижение баланса профиля микробных экзометаболитов во внутренних средах организма человека.

## Т013 РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИНЕРАЛЬНЫХ ДОБАВОК

Н.В. Бондаревич, Г.И. Новик

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Традиционно бактериофаги в промышленности рассматривались как вредители ферментации бактерий. Современное производственное оборудование включает системы с улучшенными санитарными условиями, использование закрытых чанов, непосредственную инокуляцию в чанах, размножение стартерных культур в среде, ингибирующей бактериофаг, чередование культур, использование устойчивых к фагам стартерных культур. Несмотря на все предпринимаемые меры в микробиологической промышленности фаговая инфекция является одной из главных причин снижения продукции целевых метаболитов. На сегодняшний день выделено большое количество штаммов бактериофагов, мишенями для

которых служат бактерии рода *Pseudomonas*. В связи с этим вопрос охраны производства биопрепаратов с использованием псевдомонад остается открытым и нуждается в разработке эффективных ингибиторов развития бактериофагов.

В работе изучалось влияние добавления минеральных солей в среду культивирования на процесс заражения вирусами бактерий. Объектами исследования служили бактерии *Pseudomonas fluorescens* БИМ В-582 и бактериофаг БИМ BV-53 из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов.

В эксперименте проводилось построение лизис-профиля фага при культивировании в питательном бульоне на основе гидролизата кильки с добавлением минеральных солей в трех концентрациях: 1 мМ, 10 мМ, 50 мМ. Контролем служил питательный бульон без добавок.

По результатам серии экспериментов существенное влияние оказывало присутствие в среде солей в концентрации 50 мМ. Время лизиса было дольше на 20–40 минут в сравнении с контролем для  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . В случае добавления  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  в концентрации 50 мМ наблюдалось полное ингибирование процесса лизиса. Напротив 50 мМ концентрация солей  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KCl}$  и  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  не была критична для лизиса культуры бактерий.

Таким образом, выявлены минеральные ингибиторы литического цикла фага, определены концентрации солей, которые замедляют процесс лизиса, что может быть использовано для замедления репродукции фаговых частиц в клетке.

#### Т014 ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ПАТОГЕННОСТЬ ЛАКТОБАЦИЛЛ И ЭНТЕРОКОККОВ

В.М. Бондаренко

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва, Россия

С позиции микробиолога производственные штаммы бактерий, входящие в состав пробиотиков, следует характеризовать по наличию факторов адаптации (1) и пробиотической активности (2). За адаптацию интродуцента ответственны факторы, позволяющие бактериям прикрепиться к эпителию и колонизировать биотоп, конкурируя с биопленкой индигенной микрофлоры, что непосредственно связано со сроками его персистенции, длительностью поддержания микробного баланса нормальной флоры и обеспечения временной защиты слизистой оболочки от повреждения. К первым следует относить адгезины, капсулы, органические кислоты, бактериоцины, биосурфактанты, факторы, определяющие биопленкообразование. Ко вторым локальную конкуренцию в отношении нутриентов, активацию синтеза антимикробных факторов слизистой оболочки, восстановление межмикробных коммуникаций и иммуномодулирующее действие. Это могут быть бактериальные антимикробные субстанции, оригинальные пептиды, ДНК и различные метаболиты, включая летучие жирные кислоты.

При снижении иммунологической резистентности возможна транслокация как индигенных микроорганизмов, так и интродуцента из биотопа в системный кровоток с угрозой развития патологического состояния. Ряд функций защитной микрофлоры аналогичны таковым, характерным для патогенных бактерий. В связи с этим становятся понятными работы, свидетельствующие о способ-

ности *Lactobacillus spp.* обуславливать развитие кариеза, воспалительных процессов полости рта, хронических эндокардитов, менингитов и пневмоний. Известна бессимптомная бактериурия беременных, вызванная лактобациллами. В качестве этиологических факторов определены *L. casei*, *L. brevis*, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, изолированные при различных гнойно-воспалительных процессах у иммунодефицитных лиц. При бактериемии установлена принадлежность изолятов к видам *L. rhamnosus*, *L. zeae*, *L. casei* и *L. fermentum*. Патогенность изолятов коррелировала с наличием цитотоксичности, агрегирующей активности в отношении тромбоцитов, способностью связывать фибронектин, фибриноген и синтезом холестеринзависимого гемолизина. Результаты указывают на наличие протеогликанов клеточной стенки у некоторых штаммов, *Lactobacillus*, а также *Streptococcus* и *Bifidobacterium*, которые вызывают хронический артрит, независимо от вида микроорганизма. Пептидогликаны штаммов, вызывающие острый артрит, содержат лизин в качестве третьего аминокислотного пептида PG подтипов A3alpha и A4alpha. Наличие у интродуцентов факторов, ассоциированных с патогенностью, должно быть исключено при оценке безопасности пробиотических культур. Учитывая возросшую роль *Enterococcus faecalis* и *E. faecium* нами совместно с А.Н. Суворовым было проведено сравнительное исследование 97 культур энтерококков, включающих эталонный вирулентный штамм *Enterococcus faecalis* ATCC 259212, 35 клинических изолятов *E. faecium* и 58 *E. faecalis*, а также 3 пробиотических штамма *E. faecium*: Linex (фирма Лек, Словения), SF68 (Бифиформ, Дания) и L3 (Авена, Россия). 13 из 93 культур выделены от пациентов, ранее получавших пробиотик Линекс, содержащий в своем составе бактерии *E. faecium* (Linex). Проведен сравнительный анализ культур по наличию 8 генов вирулентности: *esp*, *asa1*, *efaA*, *cylA*, *cylM*, *gelE*, *sprE* и *fsrB* в ПЦР и антибиотикограмме. Установлено, что клинические культуры энтерококков, предоставленные для анализа, в ряде случаев несли гены патогенности и не были родственны штаммам *E. faecium*, входящим в состав пробиотиков.

Важным представляется идентификация в каждом случае таксономической принадлежности изолята для отнесения его к примененному пробиотику с оценкой его потенциальной патогенности. Целесообразно не назначать пробиотики пациентам с выраженным иммунодефицитным состоянием.

#### Т015 КОРРЕКЦИЯ МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ КОЖИ С ПОМОЩЬЮ БАКТЕРИОФАГОВ

О.Ю. Борисова<sup>1</sup>, А.В. Алешкин<sup>1</sup>, Н.Т. Гадуа<sup>1</sup>,  
С.С. Бочкарева<sup>1</sup>, Б.А. Ефимов<sup>2</sup>, В.А. Чернова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

<sup>2</sup>ГОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>3</sup>Детский консультативно-диагностический центр им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Сбалансированная экосистема кожных покровов человека осуществляет функцию колонизационной резистентности в отношении транзитной микрофлоры. Изменение качественного и количественного со-

става резидентной микрофлоры кожи рассматривается как дисбактериоз, на фоне которого могут развиваться различные патологические состояния. Целью данного исследования было создание безопасного и эффективного профилактического средства на основе бактериофагов, нормализующего микробиоценоз кожных покровов человека.

На основании комплексного анализа микробиоты подмышечных впадин 66 здоровых лиц и 33 больных, страдающих бромидрозом, определены представители данного биотопа, вызывающие дисбактериоз. Полуколичественная оценка микробного состава микробиоты кожи подмышечных впадин у здоровых лиц варьировала в интервале 4–5 lg КОЕ/мл, у больных – 6–7 lg КОЕ/мл. Идентификацию выделенных микроорганизмов проводили по фенотипическим свойствам, труднокультивируемых и коринебактерий – масс-спектрометрическим методом и путем амплификации гена *groV* с последующим прямым секвенированием амплифицированных фрагментов. У здоровых лиц идентифицировано 62 культуры, относящихся к 11 видам коринебактерий, из них наибольший удельный вес имели *C. tuberculostearicum* (46,8%), *C. amycolatium* (24,3%) и *C. ureicelerivorans* (8,1%), *C. coyleae* (4,8%) и *C. accolens* (3,2%) встречались в меньшем проценте случаев, остальные коринебактерии выделяли в единичном проценте случаев. При обследовании больных идентифицировано 14 культур, относящихся к 7 видам рода *Corynebacterium*, из них наибольший удельный вес имели *C. tuberculostearicum* (33,7%), *C. ureicelerivorans* (26,6%) и *C. mucifaciens* (13,3%), остальные виды идентифицированы в единичных случаях.

На следующем этапе были изолированы из объектов окружающей среды и отобраны, используя фенотипическую и молекулярно-генетическую оценку, штаммы бактериофагов, активные в отношении выделенных у больных с бромидрозом видов коринебактерий. Оригинальные фаговые геномы были представлены двунитевой ДНК, в них отсутствовали гены, кодирующие токсины, другие факторы вирулентности и определяющие умеренный путь развития бактериофага. Проведена оценка токсичности фагового препарата для лабораторных животных. С учетом микробиологического, геномного и биоинформационного анализов выделенных фагов, полученный коктейль перспективен для нормализации микробиоценоза кожных покровов человека.

#### **T016 ОБ ОПЫТЕ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ ПРИ ВСПЫШКАХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ В ОРГАНИЗОВАННЫХ ДЕТСКИХ КОЛЛЕКТИВАХ УДМУРТСКОЙ РЕСПУБЛИКИ**

**Ю.В. Бушмакина**

*Управление Роспотребнадзора по Удмуртской Республике, Ижевск, Россия*

В Удмуртской Республике в среднем ежегодно регистрируется от 11.000 до 13.000 случаев заболеваний острыми кишечными инфекциями (далее ОКИ). Удельный вес вспышечной заболеваемости в общей структуре заболеваемости ОКИ составляет от 3,2 до 3,5% в отдельные годы. В последние годы, как при спорадической, так и при вспышечной заболеваемости, наблюдается тенденция роста интенсивных и экстенсивных показателей заболеваемости вирус-

ными диареями и снижение соответствующих показателей заболеваемости бактериальными диареями. В структуре расшифрованных кишечных инфекций доля вирусных диарей выросла с 45,1% в 2009 году до 61,8% в 2013 г. Аналогичные изменения отмечались и при вспышечной заболеваемости ОКИ: так, удельный вес эпидемических очагов ОКИ вирусной этиологии вырос с 36,3% в 2009 г. (12 из 33 эпидемических очагов) до 60% в 2013 г. (3 из 5 эпидемических очагов). Вместе с тем, актуальность возбудителей «традиционных» бактериальных кишечных инфекций (сальмонеллеза, дизентерии) в формировании эпидемических очагов в организованных детских коллективах по-прежнему сохраняется. Кроме того, бактериальные диареи у детей, как правило, характеризуются более тяжелым клиническим течением по сравнению с вирусными диареями. В связи с этим, возникает необходимость организации адекватных профилактических мероприятий при купировании эпидемических очагов кишечных инфекций бактериальной этиологии. При регистрации большинства вспышек, вызванных возбудителями бактериальной этиологии (сальмонеллой энтеритидис, шигеллой Флексер) в организованных детских коллективах в Удмуртской Республике применялись специфические бактериофаги с профилактической целью контактными лицам. Случаи заболеваний среди контактных лиц, которым проводилось фагирование с профилактической целью, зарегистрированы не были. Таким образом, в Удмуртской Республике отмечается положительный опыт применения сальмонеллезного и дизентерийного бактериофагов при регистрации вспышек кишечных инфекций бактериальной этиологии в организованных детских коллективах.

#### **T017 ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ РОДА *LISTERIA***

**Д.А. Васильев, Е.Н. Ковалева, Е.В. Сульдина**

*ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск, Россия*

Особая опасность листериоза возникла в Европе и Северной Америке в конце XX в. в связи с лавинообразным увеличением случаев контаминации пищевых продуктов листериями и летальностью до 60% у людей I группы риска. Поэтому листериоз получил наименование «пищевой инфекции» и медицинские специалисты нашей страны с 1992 г. стали признавать его как эпидемическую инфекцию.

В связи с ужесточением Европейских и Российских законодательных актов по реализации продуктов питания (пищевого сырья) при наличии листерий есть необходимость разработки системы выявления и дифференцировки бактерий рода *Listeria*. Бактериофаги являются простым и надежным инструментом для решения указанной проблемы.

Целью работы является разработка схемы выделения бактериофагов бактерий вида *L. monocytogenes* методом индукции из лизогенных культур.

Для достижения поставленной цели необходимо подобрать оптимальные параметры воздействия индуцирующих факторов на бактериальную клетку и взаимодействия бактериальных клеток и фаговых корпускул, определить рациональный метод очищения фаголизата.

Выделение и изучение биологических свойств фагов проводили по методам, предложенным Н.А. Ка-

пыриной, M.R.J. Clokie, A.M. Kropinski, Э. Каттер, А. Сулаквелидзе, С.P. Sword, M.J. Pickett, С.Н. Золотухина.

В качестве тест-штамма для оптимизации параметров индукции использовали вирулентный штамм *L. Monocytogenes* – 766, индикаторным служил референс-штамм *L. monocytogenes* 9-127. В качестве индуцирующего агента использовали ультрафиолетовые лучи (УФ-лучи), источником которых служила ртутно-кварцевая лампа, дающая не менее 90 % излучаемой энергии в виде УФ-лучей с длиной волны 254 нм. Плотность среды при облучении, время экспозиции и расстояние до источника света варьировали.

В результате проведенных исследований выделены три листериозных бактериофага, разработана оптимальная схема выделения методом индукции УФ-лучами. Экспериментально установлено, что для облучения наилучшим образом подходит жидкая слабощелочная среда, время экспозиции – 30 с, расстояние до источника излучения – 40 см.

#### **Т018 АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ БОРДЕТЕЛЛЁЗА ЖИВОТНЫХ И БРОНХОСЕПТИКОЗА ЛЮДЕЙ**

**Ю.Б. Васильева, Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Д.Г. Сверкалова**

*ФГБОУ ВПО УГСХА им. П.А. Столыпина*

В России отсутствуют официальные статистические данные по распространению бордетеллёза животных и бронхосептикоза людей, что, по нашему мнению, обусловлено отсутствием эффективных мер детекции возбудителя.

Мы разработали тест-систему индикации и идентификации бактерий *B. bronchiseptica* (ТСИИ), включающую бактериологический, иммунологический, молекулярно-генетический и фаговый компоненты.

**Бактериологическая детекция бактерий *B. bronchiseptica*** включает взятие глубоких мазков из глотки на 2 чашки Петри с дифференциально-диагностической средой с селективными компонентами и без них и культивирование в течение 24–48 ч при  $t$  35–37°C. Далее проведение отбора характерных колоний и дополнительное изучение их свойств. Срок проведения исследования 72–96 ч. **Иммунологическая детекция бактерий *B. bronchiseptica*** проводится как дополнение бактериологической идентификации при помощи пластинчатой реакции агглютинации на предметном стекле или реакции диффузной преципитации. Максимальный срок проведения анализа в течение часа. **Молекулярно-генетическая детекция бактерий *B. bronchiseptica*** включает выделение нуклеиновых кислот из культур сорбентным способом, проведение мультиплексной полимеразной цепной реакции с системами праймеров, детекция с помощью горизонтального электрофореза и в режиме «реального времени». Программа проведения ПЦР с электрофоретической детекцией – 1) 95°C–5 мин, 2) 95°C–10 сек, 62°C–10 сек, 72°C–20 сек – 40 циклов, 3) 72°C–2 мин; для детекции в режиме реального времени – 1) 95°C – 5 мин, 2) 95°C – 10 сек, 62°C – 15 сек – 40 циклов, 3) 72°C – 1 мин. **Детекция бактерий *B. bronchiseptica* специфическими фагами** осуществляют с помощью реакции нарастания титра фага (РНФ) с использованием биопрепарата «ББР-117 УГСХА». РНФ позволяет обнаружить бордетеллы в концентрации от  $10^3$  м.к. в 1 мл исследуемого биоматериала за 26 часов без выделения чистой культуры.

В качестве дополнения к бактериологической детекции проводят реакцию «стекающей капли». Срок исследования составляет до 66 ч.

ТСИИ возможно использовать для подтверждения клинического диагноза, выявления атипичных форм заболевания, обнаружения бактерионосителей в окружении больных животных, а также для установления ретроспективного диагноза.

#### **Т019 БИОПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БАКТЕРИЙ *BORDETELLA BRONCHISEPTICA***

**Ю.Б. Васильева, Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Д.Г. Сверкалова**

*ФГБОУ ВПО УГСХА им. П.А. Столыпина*

Для детекции бактерий *Bordetella bronchiseptica* мы разработали биопрепараты.

Для выделения чистой культуры бактерий *B. bronchiseptica* сконструирована дифференциально-диагностическая среда (состав г/л: пептон ферментативный 20,0; сернокислое железо – 0,02 г/л, сернокислый магний – 0,4 г/л, хлорид натрия 4,5–6,5 г/л, крахмал 5,0 г/л, мочевины 5,0 г/л, лактоза – 0,7; бромтимоловый синий – 0,02; хлорид бария – 0,4); селективные добавки (цефазолин – 0,004 г/л, ампициллин – 0,0025 г/л, флуконазол, миконазол – 0,002 г/л. рН среды  $7,0 \pm 0,2$ ). Для антигенной детекции возбудителя бордетеллёза предлагаем использовать антиген *B. bronchiseptica*, получаемый методом ультразвуковой дезинтеграцией (частота 23 кГц, амплитуда колебаний 7 микрон, в течение 1 мин. на 1 мл суспензии бактериальной массы с постоянным охлаждением в смеси спирта со льдом) и иммунную сыворотку, получаемую гипериммунизацией кроликов (предварительное внутримышечное введение смеси адъюванта Фрейнда с бордетеллёзным антигеном 1:1 в дозе 0,5 мл с последующим внутривенным введением антигена кроликам в дозах 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 и 1,5 мл с интервалом 3 дня и забором крови через 20 дней).

Для обнаружения ДНК бактерий *B. bronchiseptica* в биоматериале без выделения чистой культуры или как подтверждение бактериологического исследования рекомендуем праймеры (Pr1-1 (5' ccttcaccacacctggcggtagcaggtgtctcc 3'), Pr1-2 (5' ccccggtgccgggggtgcctggacctggcg 3') для гена BfrA ДНК *B. bronchiseptica*; Pr3-1 (5' ggagaccaggatcacatctccc 3'), Pr3-2 (5' gctttcctgtagtgg-cgtagg 3') для гена BfrZ; Pr4-1 (5' gcattgtccatcctgtttgtagc 3'), Pr4-2 (5' gatgggttatctgagcgcg 3') для гена Cytochrom-C-oxidase и Pr5-1 (5' ctacgggggaaagcggggga 3'), Pr5-1 (5' gaccgtactccccagcggg 3') для гена 16S rRNA), флуоресцентный зонд для системы праймеров участка гена *bfrZ*.

Для обнаружения бактерий *B. bronchiseptica* реакцией нарастания титра фага (РНФ) без выделения чистой культуры или в качестве подтверждения бактериологического исследования методом «стекающей капли» рекомендуем применять фаговый биопрепарат ББР–117 УГСХА. Технологические параметры изготовления препарата: получение бордетеллёзных фагов ультрафиолетовой детекцией культуры, соотношение количества фаговых корпускул и бактериальных клеток индикаторных штаммов *B. bronchiseptica* – 1:2, время инкубации при температуре 37°C – 7 ч, обработка хлороформом в пропорции 1:10 в течение 15 мин.



Разработанные биологические препараты позволяют осуществить раннюю и точную детекцию бактерий *Bordetella bronchiseptica*.

## Т020 БАКТЕРИОФАГИ, АКТИВНЫЕ В ОТНОШЕНИИ ОСНОВНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ РЫБ, И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В ЦЕЛЯХ ДИАГНОСТИКИ, ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ

Д.А. Викторов, Т.А. Гринева, Д.А. Васильев,  
И.Г. Горшков, Н.Г. Куклина

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»

Бактериальные инфекции рыб, в наибольшей степени аэромоназы и псевдомоназы, наносят ощутимый экономический ущерб интенсивно развивающейся аквакультуре. К экономическим потерям приводят повышенные уровни смертности рыбы, уменьшение темпов роста из-за инфекции и потеря товарного вида рыбы.

В настоящее время лечение бактериальных заболеваний рыб заключается в применении антибиотиков широкого спектра действия, высокомолекулярных соединений, содержащих йод, а также формалина. Для диагностики используются трудоемкие и продолжительные по времени схемы. Альтернативным диагностическим методом может стать применение бактериофагов, позволяющих надежно дифференцировать возбудителей бактериальных инфекций, а порой проводить детальную дифференциацию отдельных типов и вариантов внутри вида. Применение бактериофагов не ограничивается диагностикой, рассматриваются перспективы их применения как профилактических и лечебных средств.

В ходе проведенных исследований из объектов внешней среды были выделены бактериофаги, специфичные для бактерий *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas sobria*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*. Исследованы их основные биологические свойства: морфология негативных колоний, устойчивость к обработке хлороформом, температурная устойчивость, видовая и родовая специфичность, литическая активность.

Выделенные группой авторов бактериофаги F43-УГСХА, Ars25-УГСХА, Aer.sobr.3-УГСХА, Pф01F1-УГСХА, Pс55F-УГСХА, Psp10-УГСХА обладают широким спектром литического действия, относительно просты в получении в высоком титре, устойчивы к процедурам очистки от бактерий, и могут быть рассмотрены в качестве потенциальных компонентов при создании препарата для лечения и профилактики бактериальных заболеваний рыб, и использоваться для идентификации *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. sobria*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. putida* в объектах окружающей среды и при диагностики инфекций рыб.

## Т021 ФАГОИНДИКАЦИЯ AEROMONAS HYDROPHILA

Д.А. Викторов, И.Р. Насибуллин, И.Г. Горшков,  
Н.Г. Куклина, Т.А. Гринева, Д.А. Васильев

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»

Бактерии *Aeromonas hydrophila* широко распространены в окружающей среде и известны как возбудители аэромоназа — инфекционного заболевания многих видов рыб и других гидробионтов. Аэромоназ встречается повсеместно и наносит значительный экономический ущерб рыбководческим хозяйствам. Контаминированная аэромонадами рыбная

продукция представляет собой источник пищевых инфекций человека.

Индикация и идентификация аэромонад является трудоемким и длительным (до 120 ч) процессом. Типирование до рода *Aeromonas* требует применения сложных и дорогостоящих сред и проведения ряда узких тестов, что обуславливает недостоверность исследования. Внутривидовая идентификация из-за незначительных различий между видами сложна и может служить причиной ошибок.

В результате проведенных исследований из объектов окружающей среды (103 пробы воды из водоемов Ульяновской области) были выделены бактериофаги, активные в отношении бактерий *Aeromonas hydrophila*, исследованы их основные биологические свойства и разработан диагностический биопрепарат. На основе созданного биопрепарата предложен новый метод индикации *Aeromonas hydrophila* с применением реакции нарастания титра фага.

Препарат бактериофага F43-УГСХА обладает всеми необходимыми для проведения РНФ свойствами: титр бактериофага  $2,0 \times 10^8$ , спектр литической активности 86,7%, строгая специфичность по отношению к бактерии *A. hydrophila*.

Разработана схема постановки РНФ с использованием биопрепарата бактериофага F43-УГСХА, которая позволяет проводить индикацию *Aeromonas hydrophila* в различных объектах количестве от  $10^3$  м.к./мл в течение 24 ч. Реакция обладает высокой чувствительностью, специфичностью, не требует выделения чистой культуры возбудителя, дорогостоящего оборудования и материалов, методика достаточно проста.

Все перечисленное позволяет судить о высокой экономической эффективности метода РНФ в сравнении с существующими методами индикации аэромонад.

## Т022 ЭКОЛОГИЯ ПИТАНИЯ — ЭТО ПРОБИОТИЧЕСКИЕ ПРОДУКТЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

А.В. Витавская, Г.Н. Дудикова, Д.Б. Баймуханова,  
А.Ж. Рустемова, Ю.Г. Пронина

Алматинский технологический университет, Казахский НИИ перерабатывающей и пищевой промышленности, г. Алматы, Республика Казахстан

Почвенные микроорганизмы *B. subtilis*, попадающие с земли на зерно, а затем в муку в споровой форме при соприкосновении с водой, т.е. на стадии приготовления теста, остаются в физиологически активном состоянии до зоны выпечки, когда при температуре 92–96°C они снова переходят из вегетативной формы в спору и ожидают благоприятного момента, когда можно снова дать рост и проявлять ферментативную активность.

Цель — выявить наличие продуктов жизнедеятельности молочнокислых бактерий в тесте, в том числе антибиотико-подобные вещества, подвергающиеся влиянию высоких температур.

В момент выхода горячего хлеба из печи посевы контрольных (без добавления закваски) и опытных проб (с добавлением закваски) выявили одинаковую картину — на чашках Петри дали рост колонии *B. subtilis* одинаковое количество. Однако, по мере хранения хлеба в провоцирующих условиях (температура 37°C, относительная влажность 85%), контрольный вариант заболел через 18 часов, а в опытном, куда добавляли 10% к массе муки высококислотной закваски мезофильных молочнокис-

лых бактерий, никаких признаков порчи хлеба не наблюдалось через 5 суток и более.

С целью проверки активности лактобацилл в хлебе после термической обработки водную вытяжку из биомассы исследуемого штамма прогревали при 96°C в течение 30 минут (продолжительность выпечки хлеба) в кипящей водяной бане, затем в течение 18–20 часов проводили экстракцию при температуре 8°C с последующим определением антибиотической активности методом лунок и биоавтографии. Контрольную вытяжку термической обработке не подвергали.

В итоге у 35 из 78 исследуемых штаммов продуцируемые ими лактоцины полностью инактивируются. Лишь у 18 штаммов, представленных в основном видами *L. fermentum*, *L. casei* и *L. delbrueckii*, антимикробная активность незначительно уменьшилась. Так что отдельные штаммы молочнокислых бактерий пшеничных заквасок продуцируют термоустойчивый антибиотик, сохраняющийся в хлебе после выпечки и предохраняющий хлеб от порчи.

Известно, что антибиотики, продуцируемые молочнокислыми бактериями, относятся к полипептидам. В процессе тестоведения антибиотическое вещество, влияя на гнилостную микрофлору теста, с другой стороны, испытывает действие экзопротеаз бактерий группы *B. subtilis*, вызывающих разрушение белкового вещества. При отборе сильных штаммов – антагонистов из молочнокислых бактерий пшеничных заквасок важно установить влияние протеолитических ферментов на антибиотическую активность исследуемых лактобацилл. Для этого отцентрифугованную биомассу бактерий растирали с песком и экстрагировали дистиллированной водой. Полученную водную вытяжку разливали на три равные части, в две из которых вносили раствор протеолитических ферментов, а третья была контрольной. В качестве бактериального протеолитического фермента использовали 0,005% водный раствор протосубтилина, а животного происхождения – пепсин, приготовленный в буферном растворе с pH 2,0. Антибиотическую активность проверяли методом лунок и нанесением вытяжек на хроматографическую бумагу с дальнейшим биопроявлением на агаре.

Результаты показали, что обработка протосубтилином заметно снижает, а в отдельных случаях полностью инактивирует антибиотик, более чем у половины штаммов лактобацилл. Пепсин практически не влияет на активность лактоцинов – лишь у отдельных штаммов отмечено незначительное снижение. Наибольшее количество штаммов, продуцирующих лактоцины, устойчивые к действию протеолитических ферментов, представлены видами *L. fermentum*, *L. buchneri*, *L. plantarum*, *L. lieihmannii*.

С целью выделения активных штаммов мы изучали антагонистические свойства молочнокислых бактерий к картофельной палочке, выделенных из пшеничных заквасок хлебозаводов г. Алматы. На основании проведенных исследований, нами для приготовления заквасок на питательной среде, состоящей из пшеничной муки первого сорта и воды, установлено, что при непрерывном культивировании в среде создается симбиотическая ассоциация штаммов молочнокислых бактерий – сильных антагонистов гнилостной микрофлоры муки – *L. fermentum*-27, *L. plantarum*-149, *L. brevis*-105 и *L. casei var alactosus*-139, испытанных и подтверж-

денных на отсутствие токсигенности в лаборатории дизентерии и прочих острых кишечных заболеваний НИИ эпидемиологии микробиологии и инфекционных болезней Министерства здравоохранения РК, обеспечивающих невосприимчивость к болезни и надлежащую экологию хлеба.

Наш биологический способ защиты хлеба, основанный на антагонизме заквасок молочнокислых бактерий к условно-патогенной микрофлоре включает схему непрерывно-поточного приготовления закваски из цельнозерновой пшеничной муки крупного помола и воды. Такие закваски можно использовать для приготовления пребиотических и пробиотических продуктов питания.

Например, зерновые виды хлеба «Метелка», «Идеал», «Элитный», «Хлеб для мужчин» мы относим к пребиотическим или функционального назначения, режимы выпечки указанных видов хлеба традиционные, т.е. молочнокислые бактерии, находящиеся в тесте при температуре 92–96 °C погибают, но продукты их жизнедеятельности остаются. Как правило, в таких видах хлеба мы предусматриваем содержание клетчатки в 10–15 раз.

В пробиотических продуктах питания, благодаря холодной технологии, мы сохраняем молочнокислые бактерии в жизнедеятельном состоянии называя продукты с приставкой «био». В настоящее время мы пытаемся получить не только хлебные биопродукты, но и напитки, биосласти.

На выставках мы демонстрируем сухие пробиотические напитки например, «Овес пророщенный измельченный», «Малиновый звон», напиток «Антидиабет», биопастилу плодово-ягодную или «Кулага по-казахстански» и др. Указанные новые продукты питания богаты продуктами жизнедеятельности молочнокислых бактерий, витамином С, группы В, Е, пищевыми волокнами, комплексом ферментов, биофлавоноидами, глюкозой, фруктозой, инулином, кремнием и другими биологически активными веществами. Указанные продукты должны стать нормой ежедневных рационов для всего населения Республики Казахстан, как наиболее уязвимого в силу насыщенности экологического опасного статуса для здоровья, из-за многочисленных испытательных регионов, а также рудников, нефтедобывающих и других объектов.

## **Т023 ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА**

**Б.И. Вишневецкий, О.А. Маничева**

*ФГБУС Пб НИИ фтизиопульмонологии Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия*

В современных дефинициях вирулентности возбудителей инфекций указано, что вирулентность определяется как относительная способность патогена преодолевать защитные барьеры макроорганизма. Поэтому вирулентность зависит как от свойств самого инфекционного агента, так и от чувствительности (восприимчивости) либо иммунологической резистентности организма-хозяина, экологической внешней средой для патогена. Это особенно актуально для туберкулеза, поскольку примат макроорганизма при этом заболевании не вызывает сомнений.

Для проявления вирулентных свойств МБТ наибольшее значение имеют два феномена – это адаптация возбудителя к условиям макроорганизма-хозя-

ина и вызываемая микобактериями альтерация его клеток и тканей. Следует отметить, что по закону параллельной эволюции Н.И.Вавилова инфекционные патогены приобрели способность справляться с ответной (защитной — воспаление, фагоцитоз, антительный ответ) реакцией хозяина. Так, МБТ избегают ответной реакции макроорганизма, выживая в инфекционных грануломах, локализованных в организме. Естественная экониша для МБТ — фагоциты хозяина.

Эволюционная стратегия паразитизма МБТ — это сочетание медленно текущей инфекции (сохранение жизни каждой отдельной бактериальной популяции) и неизбежная реактивация некоторой небольшой доли латентных популяций, обеспечивающая горизонтальную передачу инфекции.

Из инфекционной эпидемиологии известно, что нарастание и вспышки инфекционных заболеваний сопровождаются повышением вирулентности возбудителя. Однако в эпидемиологии туберкулеза подобные исследования не проводились. В этом отношении представляют интерес циклические изменения вирулентности МБТ, исследование которых в соотношении с заболеваемостью туберкулезом проводились в СПбНИИФ в течение 45 лет — с 1967 по 2012 годы.

Этапы	Число штаммов с выраженной вирулентностью (%)	Заболеваемость (на 100000 населения)
1967 (n=109)	88,9	78,5
1987 (n=60)	58,0	42,5
1992 (n=37)	42,1	35,0
2002 (n=55)	70,2	88,2
2007 (n=66)	61,1	78,0
2012 (n=70)	53,0	68,1

Выявлено практически полное совпадение циклической изменчивости вирулентности МБТ и заболеваемости туберкулезом, позволяющее сделать вывод, что вирулентность может быть индикатором эпидемиологических изменений на уровне региона или всей страны. Но для этого необходимо регулярное исследование репрезентативного количества штаммов МБТ на протяжении определенного временного периода.

#### **T024 БАКТЕРИОФАГИ, АКТИВНЫЕ ПРОТИВ ГИПЕРВИРУЛЕНТНЫХ (ГИПЕРМУКОИДНЫХ) ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

Н.В. Воложанцев<sup>1</sup>, В.П. Мякинина<sup>1</sup>, Э.А. Светоч<sup>1</sup>, В.М. Красильникова<sup>1</sup>, А.В. Попова<sup>1</sup>, В.В. Веревкин<sup>1</sup>, В.А. Баннов<sup>1</sup>, А.И. Борзилов<sup>1</sup>, О.В. Коробова<sup>1</sup>, А.И. Князева<sup>1</sup>, Е.И. Асташкин<sup>1</sup>, Н.К. Фурсова<sup>1</sup>, В.Е. Маликов<sup>2</sup>, О.Н. Ершова<sup>3</sup>, И.А. Дятлов<sup>1</sup>, Е.П. Селькова<sup>4</sup>, Т.А. Гренкова<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболensk

<sup>2</sup>ГБУЗ ИКБ №1, Москва

<sup>3</sup>НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н.Бурденко, Москва

<sup>4</sup>ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва

В последние годы в популяции клебсиелл стали все чаще выявляться новые высоковирулентные варианты (hvKp), которые в отличие от «классических» *K. pneumoniae* (сКр) вызывают как госпитальные, так и внегоспитальные инфекции с характерными клиническими проявлениями в виде гнойных абсцессов печени, имеющих тенденцию к метастазированию

с развитием менингитов, эндофтальмитов, инфекций мягких тканей, мочевыводящих путей и легких. Характерным признаком большинства штаммов hvKp является гипермукоидность, связанная, как полагают, с повышенным количеством капсульного материала, не отличающегося по составу от поверхностных полисахаридов сКр-штаммов.

Применение литических бактериофагов, обладающих полисахарид-деполимеразной активностью — один из возможных путей решения серьезной терапевтической проблемы, которую представляют инфекции, вызываемые hvKp-штаммами.

В ходе анализа образцов клинического материала выделены более 20 «чистых» линий бактериофагов, лизирующих *K. pneumoniae*, в том числе штаммы, выделенные в клинических условиях в последние 2-3 года. Определен спектр литического действия бактериофагов на коллекции из 130 штаммов *K. pneumoniae*. Установлено, что бактериофаги лизируют от 2,5 до 60% штаммов *K. pneumoniae*.

Выделены два бактериофага, лизирующих hvKp-штаммы; определены параметры их литического действия, получены данные о структуре фаговых геномов. На лабораторной модели hvKp-инфекции у мышей изучена лечебно-профилактическая эффективность одного из hvKp-специфических бактериофагов. Показано, что внутрибрюшинное введение бактериофага (1 млрд БОЕ, дважды в сутки в течение 5 дней) через 1 час или 12 час. после подкожного инфицирования hvKp-культурой в дозе 200 LD-50 приводит в обоих случаях к 100%-му выживанию животных с полной элиминацией бактериальной культуры (при 100%-ой гибели животных в контрольной группе, не получавших бактериофаг). При начале фаготерапии через 24 ч после инфицирования выживаемость животных составляла от 67 до 83% (при разных схемах лечения).

#### **T025 ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ В ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ НОЗОКОМИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

Е.А. Воропаева<sup>1</sup>, В.А. Алешкин<sup>1</sup>, С.С. Афанасьев<sup>1</sup>, В.К. Гостищев<sup>2</sup>, А.В. Караулов<sup>2</sup>, М.С. Афанасьев<sup>2</sup>, У.С. Станевич<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России

**Цель исследования:** определение ведущих нозокомиальных возбудителей распространенного гнойного перитонита, их чувствительности к антибактериальным препаратам и бактериофагам.

**Материалы и методы исследований.** Обследованы 40 пациентов с распространенным гнойным перитонитом. Выделение, идентификацию, определение чувствительности к антибиотикам и бактериофагам микроорганизмов проводили стандартными методами. Выявление «островков патогенности» — методом ПЦР.

**Результаты исследований и их обсуждение.** При обследовании пациентов выделены 15 штаммов: 2 *Acinetobacter baumannii*, 1 *Acinetobacter haemolyticus*, 1 *Enterococcus bovis*, 2 *Enterococcus faecalis*, 4 *Enterococcus faecium*, 2 *Escherichia coli*, 3 *Pseudomonas aeruginosa*, с высокой устойчивостью к антибактериальным препаратам и наличием комплекса «островков патогенности», повышающих вирулентность бактерий. Выявление генетических маркеров устойчивости

к фторхинолонам и бета-лактамам совпадало с результатами, полученными диско-диффузионным методом у 75% и 62,5% штаммов, соответственно. При определении чувствительности выделенных штаммов к бактериофагам установили, что *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Enterococcus bovis* чувствительны к «Интести-бактериофагу», «Бактериофагу синегнойному» и «Колли-протейному бактериофагу» в высокой степени. Применение комбинированного препарата из перечисленных бактериофагов предотвращало развитие нозокомиального перитонита и смену возбудителей в случаях послеоперационного перитонита. Развитие «нозокомиального» перитонита на фоне проведения фаготерапии составило 30,77%, что более чем в 3 раза ниже, по сравнению с контрольной группой пациентов, у которых процент развития нозокомиального перитонита после 5-ой санации был близок к 100%. В связи с отсутствием коммерческого фагового препарата в отношении *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter haemolyticus* и *Enterococcus faecalis* Государственным научным центром прикладной микробиологии (ГНЦ ПМ) оказана консультативная помощь и произведен поиск адекватных фаговых препаратов из коллекции института. Такие бактериальные вирусы найдены, их активность на питательных средах в несколько превосходит чувствительность к антибиотикам.

**Заключение.** Применение адаптированных бактериофагов в лечении вторичного и нозокомиального распространенного гнойного перитонита заметно повышает эффективность проводимой терапии.

#### **T026 ГЕНОТИПЫ ШТАММОВ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДЕТЕЙ С ОСТЕИТАМИ**

А.А. Вязовая<sup>1</sup>, Т.Ф. Оттен<sup>2</sup>, А.Ю. Мушкин<sup>2</sup>,  
В.Ю. Журавлев<sup>2</sup>, Б.И. Вишневский<sup>2</sup>, И.В. Мокроусов<sup>1</sup>,  
О.В. Нарвская<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Показатель частоты костных осложнений вакцинации в регионах РФ колеблется от 1,9 до 21,7 на 100 тыс. вакцинированных.

Целью исследования была идентификация и генотипирование изолятов *M. tuberculosis complex* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG), полученных от детей при подозрении на БЦЖ-остит.

**Материалы и методы.** Идентификацию 162 культур *M. tuberculosis complex*, полученных (2007-2010 гг.) от вакцинированных БЦЖ детей, проводили с помощью стандартных микробиологических методов, мультиплексной ПЦР со специфическими праймерами (Talbot et al., 1997) и сполитипирования (Kamerbeek et al., 1997). Изоляты *M. bovis* (n=1) и *M. bovis* BCG (n=65) типированы по 12 локусам MIRU и дискриминирующим локусам VNTR: ETR-A, ETR-B, ETR-C, QUB11b, QUB 26, QUB 4156, QUB 3232, M.tub04, M.tub21, M.tub30. Образцы ДНК лабораторных штаммов *M. bovis* BCG, H37Rv и трех препаратов вакцины БЦЖ использованы в качестве контролей.

**Основные результаты.** Установлена принадлежность 35 клинических изолятов к *M. tuberculosis*, 126 – *M. bovis* BCG и одного штамма к *M. bovis*. Среди 35 штаммов *M. tuberculosis* преобладали (71,4%) штаммы генотипа Beijing (SIT: 1, 190, 265, 269). Все

штаммы *M. bovis* BCG имели сполитотип SIT482, *M. bovis* –SIT3748.

Числовой 12-локусный профиль MIRU 222324253322 (MIT5, согласно SITVIT\_WEB) 63 из 65 клинических штаммов *M. bovis* BCG был идентичен таковому трех российских вакцинных штаммов и *M. bovis* BCG (Supply et al., 2001). Два штамма имели профиль MIT49 (232324253322) за счет 3 повторов в локусе MIRU4. Штамм *M. bovis* имел уникальный профиль – 252324253322 (не имеющий аналогов в базе данных) за счет 5 повторов в локусе MIRU4. Полученные данные подтверждены секвенированием локуса MIRU4 двух штаммов *M. bovis* BCG (MIT5, MIT49) (GenBank: KC345034.1; KC713595.1) и одного *M. bovis*.

Числовые профили VNTR типирования по 10 дополнительным локусам – 5553505012 также были идентичны в трех образцах вакцины БЦЖ, лабораторного и клинических штаммов *M. bovis* BCG, за исключением одного с 2 повторами в локусе QUB11b.

**Заключение.** В нашем исследовании этиологическим агентом костных поражений у 78% вакцинированных БЦЖ детей являлся *M. bovis* BCG (SIT482). Профиль MIRU-VNTR 2223242533225553505012 выявлен у 95% клинических штаммов *M. bovis* BCG и всех образцах вакцины.

#### **T027 К ВОПРОСУ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭКОЛОГИИ ХИРУРГИЧЕСКОГО СТАЦИОНАРА**

Н.И. Габриэлян, Н.И. Романова, Н.М. Есенова,  
И.В. Драбкина

ФНЦТИО им. ак. В.И.Шумакова, Москва, Россия

**Состояние вопроса.** Вопросы экологии стационара, путей и резервуаров возбудителей бактериальных инфекций, являются актуальными для решения проблемы осложнений, связанных с оказанием медицинской помощи.

**Цель работы** – анализ данных, характеризующих особенности экологии бактериальной флоры хирургического стационара и путей трансмиссии микроорганизмов.

**Материалы и методы.** Данные получены при проведении санитарно-бактериологических исследований хирургического стационара. Используются стандартные методы, рекомендованные действующими постановлениями и приказами.

**Результаты.** Сравнительный анализ показал, что наиболее высокий уровень контаминации внешней среды характерен для отделения реанимации и интенсивной терапии. Изучение фенотипических особенностей, в частности устойчивости к действию антибиотиков позволило сделать заключение о высоком уровне полирезистентности изолированных микроорганизмов. Одним из важных аспектов выявления способов снижения уровня послеоперационных инфекций, связанных с медицинской деятельностью является выявление и оценка значимости резервуаров госпитальной флоры. Показано, что в качестве резервуаров могут выступать поверхности диагностической лечебной аппаратуры, предметы медицинского назначения, такие как столики для перевязок, шкафы для медикаментов и др.

Опубликованные ранее данные свидетельствуют в пользу того, что актуальные для современных стационаров патогены, *Acinetobacter* и *Pseudomonas*, в течение длительного времени могут персистиро-

вать на предметах внешней среды. Низкой контроль качества дезинфекции палаты при выписке пациента способствует риску колонизации госпитальными патогенами следующего поступающего в палату пациента. Собственные исследования показали, что основными путями передачи является трансмиссия нозокомиальных патогенов, контаминирующих руки и спецодежду медицинского и обслуживающего персонала

**Заключение.** Не вызывает сомнения, что уровень и характер микробиологической обсемененности госпитальной среды стационара во многом связан с факторами и процессами, детальный анализ которых может способствовать повышению эффективности медицинской помощи, в частности результатов высокотехнологичных хирургических операций.

### **T028 ВЛИЯНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ ПАТОГЕННЫХ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

**Н.Н. Гаврилова, И.А. Ратникова, А.К. Саданов**

*РГП на ПХВ «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан*

Для борьбы с патогенной микрофлорой часто используются средства растительного происхождения.

**Цель исследований:** изучение влияния лекарственных растений на устойчивость к антибиотикам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

**Материалы и методы.** Исследования проводили с водными и спиртовыми растительными экстрактами растений, обладающими высокой антимикробной активностью. Патогенные и условно-патогенные микроорганизмы культивировали на питательной среде Гаузе-2. Устойчивость к антибиотикам определяли методом промышленных дисков.

**Результаты.** Установлено, что многие растительные экстракты влияют на резистентность микроорганизмов к антибиотикам. Так, у *Klebsiella pneumoniae-444* повысилась резистентность к левомицетину под влиянием спиртовых экстрактов из наземной части тысячелистника, имбиря и цветов белой акации (диаметр зон подавления роста 0 по сравнению с 10 и 8 мм в контроле при концентрации антибиотика 100 и 50 мкг/мл, соответственно) и несколько снизилась устойчивость под воздействием спиртового экстракта из корней зверобоя. Повышение устойчивости к бисептолу отмечено у *Staphylococcus aureus-209p* под влиянием спиртового экстракта из корня зверобоя (0 по сравнению с 14 и 10 мм в контроле), а понижение — под воздействием спиртовых экстрактов розмарина, куркумы и водного экстракта зверобоя. У данной тест-культуры отмечено также понижение резистентности к левомицетину и под воздействием спиртового экстракта тысячелистника сухого. Клинический штамм *S. aureus-2* приобрел резистентность к бисептолу при росте в среде, содержащей спиртовой экстракт корня зверобоя. Водный экстракт зверобоя повышает устойчивость клинического штамма *S. aureus-12* к бисептолу, левомицетину и ципрофлоксацину. Отмечено понижение резистентности этого штамма к бисептолу, к ципрофлоксацину под влиянием спиртового экстракта розмарина и к левомицетину под воздействием спиртового экстракта из корня зверобоя.

**Выводы.** Экстракты лекарственных растений влияют на резистентность к антибиотикам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Это необходимо учитывать при применении растений в комплексной терапии.

### **T029 ПРИЗНАКИ БАКТЕРИОФАГОВ ХОЛЕРНЫХ И ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ, ПОЗВОЛЯЮЩИХ ОПРЕДЕЛЯТЬ ИХ ВИДОВУЮ ПРИНАДЛЕЖНОСТЬ**

**Н.Е. Гаевская, Т.А. Кудрякова, Л.Д. Македонова, Г.В. Качкина**

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия*

Проведение идентификации фагов патогенных вибрионов является актуальной проблемой, тесно связывающей между собой такие вопросы, как строение вириона, антигенная структура и литическая специфичность при взаимодействии фага с клеткой-хозяином.

Целью нашей работы было охарактеризовать признаки бактериофагов холерных и парагемолитических вибрионов, позволяющих определить их видовую принадлежность.

Для первичной идентификации различных по морфологической структуре фагов необходимо иметь набор фагочувствительных штаммов. Предложенный набор тест-культур *V. cholerae* O1 ( $ctx^+tcp^+$ ,  $ctxtcp^+$ ), *V. cholerae* O139 серогруппы ( $ctx^+tcp^+$ ) для выделения холерных фагов при мониторинге окружающей среды на вибриофлору позволяет обнаруживать бактериофаги. Морфогруппы и серотипы изолированных холерных фагов коррелируют со свойствами обнаруженных фагов в лизогенных штаммах холерных вибрионов эльтор, циркулирующих в реках в эпидемический сезон. Депонированные тест-штаммы *V. parahaemolyticus* KM-97, KM-184 используются для первичной идентификации бактериофагов парагемолитических вибрионов.

Метод электронной микроскопии позволил выявить у холерных бактериофагов 5 морфогрупп I-V, *V. Parahaemolyticus* — 4 морфогруппы (I, III, IV, V).

Изучение антигенных свойств выделенных фагов с применением кроличьих моносывороток показало принадлежность холерных фагов к 12 серотипам фагов, *V. Parahaemolyticus* — к 11 серотипам. Бактериофаги *V. parahaemolyticus* не имели перекрестных реакций с антисыворотками к фагам *V. cholerae*.

Специфичность фагов в отношении хозяина подтверждена на большом наборе представителей близкородственных микроорганизмов, которые не лизировали испытываемые фаги.

Определен комплекс идентификационных признаков бактериофагов вибрионов *V. cholerae* и *V. parahaemolyticus*:

- а) определение морфогруппы;
- б) специфичность литического действия, подтверждаемая на соответствующих видах микроорганизмов, применение тест-штаммов вибрионов;
- в) отсутствие антигенного родства с бактериофагами других видов.

Таким образом, биологические свойства бактериофагов холерных и парагемолитических вибрионов характеризуются видовыми различиями. При этом общей биологической особенностью у них является литическая специфичность при взаимодействии с клетками хозяев, которая является важной составля-

ющей препаратов фага для лабораторной диагностики возбудителей холеры и пищевых токсикоинфекций, вызванных паразитическими вибрионами.

### **Т030 БИФИДОБАКТЕРИИ С $\beta$ -ГАЛАКТОЗИДАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРОДУКТОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ЗНАЧЕНИЯ.**

**Н.А. Головнева, Н.Е. Рябая, А.Н. Морозова**

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Благодаря многогранному спектру положительно-го воздействия на макроорганизм, бифидобактерии широко используются в составе препаратов пробиотиков, а также являются компонентами продуктов функционального питания. Как показали исследования, представители нормальной микрофлоры кишечника (в том числе р.р. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) синтезируют  $\beta$ -галактозидазу, способствуют усвоению лактозы организмом человека. Бифидобактерии, как правило, содержат несколько изоферментов  $\beta$ -галактозидазады, которые отвечают за специфическую гидролитическую или синтетическую реакцию метаболизма лактозы или других углеводов.

Определены термо- и рН-оптимумы действия, охарактеризована стабильность  $\beta$ -галактозидазы штамма бифидобактерий, перспективного для использования в составе заквасок для пищевой промышленности. Оптимум гидролитического действия внеклеточного и внутриклеточного ферментов наблюдается при рН 5–6,5 и температуре 50°C. В щелочных условиях происходит снижение активности (в 2 раза при рН 8,5). При кислых значениях рН 2,5–3,5 наблюдается инактивация внеклеточного фермента, активность внутриклеточной  $\beta$ -галактозидазады составляет 30–40% от оптимального значения. Показано, что внутриклеточный фермент активен при низких температурах (+4–8°C).

Исследовано накопление галактоолигосахаридов в условиях *in vitro* при использовании в реакционной смеси бактериальных клеток и очищенной  $\beta$ -галактозидазы, выделенной из клеток бифидобактерий. Показано, что  $\beta$ -галактозидаза проявляет трансгликозилирующее действие независимо от источника углерода в среде и фазы роста бифидобактерий. Олигосахариды обнаружены в реакционной смеси при использовании клеток и ферментных препаратов  $\beta$ -галактозидазы различной степени очистки. Трансгликозилирующее действие фермента зависит от рН реакционной смеси и температуры, более выражено при длительном воздействии фермента и высокой концентрации субстрата. Оптимальными условиями трансгликозилирования являются рН 7,0–7,5, температура – 37–50°C. Продукция галактоолигосахаридов также установлена при утилизации бифидобактериями лактозы молока. Методом ТСХ показан полный гидролиз лактозы клетками бифидобактерий за 4 часа ферментации с образованием фракции олигосахаридов.

### **Т031 ОРГАНИЗАЦИЯ АДСОРБЦИОННОГО АППАРАТА ДВУХ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ Т5-ПОДОБНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ**

**А.К. Голомидова, Н.С. Прохоров, Е.Е. Куликов, А.В. Летаров**

*ФГБУН «Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского» РАН, Москва, Россия*

Бактериофаг *E. coli* T5 и близкородственный ему фаг BF23 используют для адсорбции порины внешней мембраны FhuA и VtuB, соответственно, с которыми взаимодействуют белок Oad (для T5) или Hrs (для BF23). Три

L-образные боковые хвостовые фибриллы (LTFs) фага T5 выполняют функцию распознавания O-антигена, что приводит к более эффективной адсорбции на штаммах, продуцирующих полирамнозный O-антиген. В своей работе мы проводили исследование адсорбционного аппарата колифагов (DT57C и DT57-1\2). Определение полных геномных последовательностей фагов DT57C и DT57-1\2 выявило, что эти геномы практически идентичны, за исключением нескольких локусов. Биоинформатический анализ показал, что в отличие от T5 и BF23 наши изоляты имеют разветвленные LTF состоящие из 2-х фибриллярных белков LTF1 и LTF2. Такое устройство фибрилл, до сих пор не было описано у T5-подобных сифовирусов. Рецептор связывающие домены белков LTF2, которые отличаются у фагов DT57C и DT57-1\2 распознают различные типы O-антигенов. Данное заключение было сделано, на основе исследования, в результате которого были получены рекомбинанты: фаг DT57C с доменом белка LTF2 от фага DT57-1\2, обладающий хозяйским спектром фага DT57-1\2 и фаг DT57-1\2 с доменом белка LTF2 от фага DT57C с хозяйским спектром фага DT57-1\2. При этом рекомбинация с фрагментом гена LTF1 изменений спектра хозяев не вызывает. В результате длительного культивирования фага DT57C на штамме С-600 (не имеющего O-антигена) получен изолят, который потерял способность адсорбироваться на культуре 4s с разветвленными полисахаридами O-антигена. При определении последовательности LTF2, была выявлена делеция 3 нуклеотидов. Путем рекомбинации последовательность была восстановлена, что привело к возобновлению роста на штамме 4s. Это подтверждает функцию одного из доменов LTF2. Полученный амбер-мутант DT57-1\2 по LTF2 не способен инфицировать штамм 1\2 с разветвленным полисахаридом O-антигена. При визуализации фибриллярных белков с помощью криоэлектронной микроскопии у амбер-мутанта DT57-1\2 они полностью отсутствовали в отличие от фага DT57-1\2.

LTF у фагов DT57C и DT57-1\2 разветвленные. Основной фибриллой является LTF2, через нее происходит связывание с вирионом, один из ее доменов отвечает за распознавание LPS O-антигена, а другой за присоединение LTF1. Последовательности LTF1 у наших фагов почти идентичны и, видимо, связываются с каким-то общим рецептором на клетки хозяина. Это связывание увеличивает эффективность инфекции O-антиген – продуцирующих штаммов, но не существенно для роста на O-антиген дефицитных мутантах. Полученные результаты подчеркивают высокую эффективность O-антигена природных изолятов *E. coli* как средства защиты клетки от бактериофагов. Несмотря на наличие у O-антиген-продуцирующих штаммов конечного рецептора, прямое взаимодействие с ним блокируется O-антигеном, делая инфекцию зависимой от специфичных к определенным типам O-антигена фибриллярных адгезинов.

### **Т032 ВОПРОСЫ РЕПРОДУКЦИИ ПРИ ВИРУСНОМ ГЕПАТИТЕ С**

**О.А. Горская<sup>1</sup>, А.А. Дзимова<sup>2</sup>, М.А. Кучеренко<sup>1</sup>, С.А. Сельков<sup>1</sup>**  
*<sup>1</sup>ФГБУ «НИИАГ им. Д.О.Отта» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия*

*<sup>2</sup>ГБОУ ВПО СПбГПМУ МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия*

**Актуальность.** В настоящее время вирусный гепатит С бодро шагает по планете Земля. Инфицированными являются около 180 млн человек,

что составляет 3% населения планеты. Ежегодно фиксируется 3–4 млн новых случаев заражения гепатитом С. На протяжении многих лет «лидирующие» позиции по количеству инфицированных занимает Египет, где таковыми являются 15–20% населения. Наиболее оптимальная ситуация в Северной Европе – 0,1–1% населения. В России официально количество инфицированных достигает 5–8 млн человек, хотя реальные цифры могут в несколько раз выше. В 2010 г. ВОЗ признала заболевание парентеральными гепатитами глобальной проблемой. Однако, несмотря на столь серьезное положение, широкое распространение гепатита С продолжается в самых различных социальных группах. Выявление этой инфекции среди женщин детородного возраста зачастую происходит во время обследования при беременности. Передача вируса гепатита С от матери ребенку может быть основной причиной хронического гепатита С у детей. В связи с этим, исследование вертикальной передачи вируса гепатита С приобретает большое значение в настоящее время.

**Цели и задачи.** Целью нашей работы явилось исследование вертикальной передачи вируса гепатита С от инфицированных матерей их новорожденным детям. В задачи исследования входило определение частоты выявления РНК *HCV* в крови новорожденных детей от матерей с вирусным гепатитом С, выявление факторов, способствующих такой передаче, а также определение взаимосвязи между ними.

**Результаты.** Наше исследование показало частоту выявления РНК *HCV* у детей первых дней жизни 5,8%, сопоставимую с данными отечественных и зарубежных исследователей. Однако, при более прицельном исследовании факторы, способствующие вертикальной передаче вируса гепатита С от матери плоду, выявлены не были. Обнаружено, что при генотипе 1b у матери частота внутриутробной гипоксии плода возрастает, что необходимо учитывать при наблюдении за беременной женщиной и состоянием плода, а в последствии и в выборе способа родоразрешения. Для постановки диагноза гепатита С ребенку необходимо дальнейшее динамическое наблюдение.

### **Т033 ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИОФАГОВ С ПОЛИКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОАКУСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА**

О.И. Гулий<sup>1</sup>, Б.Д. Зайцев<sup>2</sup>, И.Е. Кузнецова<sup>2</sup>,  
А.М. Шихабудинов<sup>2</sup>, А.А. Теплых<sup>2</sup>, А.С. Фомин<sup>1</sup>,  
С.А. Староверов<sup>1</sup>, Л.А. Дыкман<sup>1</sup>, С.А. Павлий<sup>3</sup>,  
С.А. Коннова<sup>3</sup>, О.А. Караваева<sup>3</sup>, О.В. Игнатов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений  
и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

<sup>2</sup>ФГБУН Институт радиотехники и электроники  
им. В.А. Котельникова РАН, Саратов, Россия

<sup>3</sup>Саратовский государственный университет  
им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

В последние годы активно развиваются исследования в области разработки новых методов детекции вирусов бактерий для получения результата в короткое время. Одним из перспективных методов развития данного направления является применение электроакустического анализа, основанного на регистрации биоспецифических реакций в жидкой суспензии, контактирующей с поверхностью пьезоэлектрика. Пьезоэлектрические резонаторы

с поперечным электрическим полем представляют интерес для исследования свойств различных жидкостей, поскольку реагируют на изменение как ее вязкости, так и проводимости.

Для идентификации вирусов используют различные подходы, такие как микробиологические и биохимические тесты, методы генной инженерии и иммунологические методы. Иммунологические методы, основанные на определении вирусных антигенов, относятся к наиболее распространенным методам определения бактериофагов и вирусов. Серологическая диагностика позволяет идентифицировать вирус даже в том случае, когда выделение вирусных частиц из образца не дало никаких результатов. Современная иммунохимия предлагает широкий ассортимент качественных и количественных методов анализа антигенов, отличающихся по чувствительности и степени сложности, при этом чувствительность метода определения вирусных антигенов напрямую зависит от качества полученных антител. Мы исследовали возможность получения антител, специфичных к бактериофагу, и изучали возможность их использования для детекции бактериофагов с помощью метода электроакустического анализа. В качестве модельного образца использовали бактериофаги, выделенные из клеток *A. lipoferum* штамма Sp59b – ФА1-Sp59b.

В результате проведенных исследований были впервые получены поликлональные антитела, специфичные к бактериофагу ФА1-Sp59b, и исследована возможность их применения для детекции бактериофагов с помощью электроакустического метода анализа. Установлено, что частотные зависимости реальной и мнимой частей электрического импеданса пьезоэлектрического резонатора, нагруженного суспензией вирусов с антителами, значительно отличаются от зависимости резонатора с контрольной суспензией вирусов без антител. Найден предел возможного определения бактериофагов при их взаимодействии с антителами, который составляет 10<sup>6</sup> фагов/мл. Показано, что детекция бактериофагов ФА1-Sp59b с помощью антител возможна в присутствии посторонних вирусных частиц. Результаты демонстрируют возможность регистрации взаимодействия бактериофагов с антителами и служат основой для разработки биологического датчика количественной детекции вирусов. Пьезоэлектрический резонатор с поперечным электрическим полем позволяет осуществлять детекцию бактериофагов непосредственно в жидкой фазе при взаимодействии со специфическими антителами без их иммобилизации на поверхности пьезоэлектрика. Этот подход принципиально отличается от известных способов определения бактериофагов при помощи акустических резонаторов с использованием иммобилизованных антител простотой выполнения процедуры анализа, высокой чувствительностью и быстротой получения результата.

### **Т034 КАМЕЛИН КАК ВОЗМОЖНЫЙ ПРОТЕКТОР ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)**

М.З. Догондзе<sup>1</sup>, О.А. Маничева<sup>1</sup>, Б.И. Вишнеvский<sup>1</sup>,  
К.Г. Гуриелидзе<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Научная фармацевтическая компания «Камелин», Тбилиси, Грузия

**Введение.** Применение этиотропной терапии, нацеленной исключительно на возбудителя, не может

решить проблемы направленного воздействия на вторую, более значимую в системе хозяин-патоген, составляющую — организм больного туберкулёзом, являющийся для *Mtb* внешней средой. Камелин — коммерческий препарат, обладает свойствами биостимулятора, применяется для лечения и профилактики инфекционных болезней.

**Цель** — изучить влияние камелина на гибель клеток линии ТНР-1 при заражении штаммами *Mtb* с различным уровнем цитотоксичности.

**Материал и методы.** Цитотоксичность *Mtb* (штамма  $H_{37}Rv$  и 7 клинических изолятов) изучали на модели индукции гибели макрофагов: клетки ТНР-1 ( $3 \cdot 10^4$  клеток/лунку) дифференцированные 10 нМ *phorbol-myristate-acetate*, заражали в соотношении 50 микобактерий/1 макрофаг. Через 96 ч оценивали жизнеспособность макрофагов с помощью теста окрашивания генцианвиолетом, вычисляли долю погибших клеток в сравнении с интактным контролем. Камелин (2,5 мкг/мл) вносили в опытные лунки за 20 мин. до заражения.

**Результаты.** Камелин в концентрации 25 мкг/мл оказывал цитотоксическое действие на клетки ТНР-1, при уменьшении его концентрации до 2,5 мкг/мл макрофаги сохраняли жизнеспособность на уровне интактного контроля, либо окрашивались генцианвиолетом более интенсивно. Камелин (2,5 мкг/мл) уменьшал цитотоксическое действие штамма  $H_{37}Rv$  в среднем в 4,2 раза. Способность четырех клинических изолятов *Mtb* индуцировать гибель макрофагов была средней, то есть сравнимой с таковой стандартного штамма  $H_{37}Rv$ , трех штаммов — низкой (значимо меньшей, чем  $H_{37}Rv$ ). Камелин препятствовал цитотоксическому действию трех изолятов со средней цитотоксичностью, уменьшая гибель клеток в 1,5–5,6 раза и значимо не влиял на жизнеспособность макрофагов, зараженных штаммами с низкой цитотоксичностью.

**Заключение.** Камелин обладает способностью защищать клетки линии ТНР-1 от цитотоксического действия штамма  $H_{37}Rv$  и клинических изолятов *Mtb* со средней цитотоксичностью. Необходимы дальнейшие исследования камелина как препарата, способного повышать резистентность клеток хозяина к цитотоксическому действию возбудителя туберкулеза.

### **Т035 БАКТЕРИОФАГИ ШИГА-ТОКСИН ПРОДУЦИРУЮЩИХ ЭШЕРИХИЙ: ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ЛЕЧЕБНО- ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

И.А. Дятлов<sup>1</sup>, Э.А. Светоч<sup>1</sup>, В.В. Веревкин<sup>1</sup>,  
Н.В. Воложанцев<sup>1</sup>, В.П. Мякина<sup>1</sup>, В.А. Баннов<sup>1</sup>,  
В.М. Красильникова<sup>1</sup>, А.В. Попова<sup>1</sup>, Н.К. Фурсова<sup>1</sup>,  
Е.А. Денисенко<sup>1</sup>, Н.Н. Карцев<sup>1</sup>, А.И. Борзилов<sup>1</sup>,  
О.В. Коробова<sup>1</sup>, Т.И. Комбарова<sup>1</sup>, В.Н. Борзенков<sup>1</sup>,  
М.Г. Теймуразов<sup>1</sup>, А.Г. Богун<sup>1</sup>, А.А. Кисличкина<sup>1</sup>,  
И.Г. Шемякин<sup>1</sup>, А.В. Алешкин<sup>2</sup>, С.А. Коровкин<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии,  
Оболensk, Россия

<sup>2</sup>ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия

<sup>3</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва,  
Россия

Острые кишечные инфекции, вызываемые шига-токсин продуцирующими *Escherichia coli* (STEC), регистрируются во многих странах мира, включая

Российскую Федерацию. Последняя вспышка ОКИ в РФ, обусловленная STEC, произошла в 2013 г. в г. Санкт-Петербурге. STEC-штаммы вызывают у человека тяжелые формы болезни: геморрагический колит (ГК) и гемолитико-уремический синдром (ГУС). Смертность при ГУС составляет 5–15 %. Эффективных методов лечения STEC-инфекций до настоящего времени не предложено, применение антибиотиков не рекомендуется, поскольку их использование повышает риск возникновения ГУС. В системе противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения STEC-инфекции, позитивную роль могут сыграть бактериофаги, активные против основных возбудителей ГК и ГУС. Бактериофаги могут быть использованы в качестве профилактических средств для предупреждения STEC-инфекции у людей в определенной эпидемиологической ситуации, для деконтаминации пищевого сырья и пищевых продуктов от STEC-штаммов, для борьбы с носительством STEC-возбудителей у сельскохозяйственных животных, а также в качестве диагностического экспресс-теста при идентификации STEC-возбудителей.

На сегодняшний день коллективом ГНЦ ПМБ выделена и охарактеризована коллекция бактериофагов, активных против эпидемически опасных STEC-штаммов *E. coli* O157:H7 и *E. coli* O104:H4, а также против STEC-возбудителей серогрупп O26, O55, O103, O111, O121, O125, O126, O128 и O145, нередко диагностируемых в последние годы в качестве этиологической причины ГК и ГУС. У выделенных бактериофагов изучены специфичность и спектры литической активности в отношении индикаторных культур бактериальных патогенов, чувствительность к неблагоприятным факторам внешней среды, определен рестрикционный профиль ДНК фагов и исследовано наличие в геноме фагов генов токсинов и других факторов вирулентности. Среди фагов, активных против штаммов *E. coli* O157:H7, отобран и запатентован диагностический фаг V32, обладающий высокой специфичностью и активностью.

Проведено полногеномное секвенирование фага ECD4, активного против эпидемического штамма *E. coli* O104:H4. Показана безвредность бактериофага ECD4 для лабораторных животных, длительность его персистенции в организме животных, а также профилактическая и лечебная эффективность на экспериментальной модели *E. coli* O104:H4-инфекции.

### **Т036 СРАВНЕНИЕ СЕРОДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА БЕЛКОВ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS, ПОЛУЧЕННЫХ В ЭКСПРЕССИОННЫХ СИСТЕМАХ E. COLI И P. PASTORIS**

В.И. Дятлова, А.Г. Богун, С.Ф. Бикетов

ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболensk, Московская область, Россия

Одной из приоритетных задач отечественного здравоохранения является улучшение эпидемиологической ситуации по туберкулезу. Ранняя достоверная диагностика и своевременно начатое лечение могут значительно снизить темпы распространения туберкулеза. Серодиагностика туберкулеза позволяет эффективно разграничивать активный туберкулезный процесс от латентного



туберкулеза и предыдущей вакцинации БЦЖ. Разработка серодиагностических тест-систем требует аргументированного выбора как антигенных препаратов, так и способа их получения. Дрожжевая система *P. pastoris*, в отличие от *E. coli*, позволяет получать рекомбинантные белки *M. tuberculosis* в гликозилированной форме, что сближает их по структуре с нативными антигенами и обеспечивает эффективное связывание с антителами в анализе.

Сравнение результатов ИФА (с сыворотками от 100 больных туберкулезом и 30 здоровых доноров из Саратовской области) с аналогичными антигенами (Rv0040c, Rv1837c, Rv1860, Rv2875), полученными в двух экспрессионных системах, выявило прирост чувствительности анализов (от 3 до 20%) и специфичности (от 0 до 10%) для всех белков из *P. pastoris* по сравнению с белками из системы *E. coli*. Наиболее заметное повышение чувствительности было выявлено для анализа с белком Rv0040c (с 27% до 47%), что может быть связано с формированием при фолдинге белка в *P. pastoris* нативных конформационных эпитопов, связывающих дополнительные антимикобактериальные антитела. Чувствительность ИФА с белком Rv1837c при «смене» экспрессионной системы с *E. coli* на *P. pastoris* возросла с 42% до 45%, Rv1860 – с 47% до 55%, а с Rv2875 – с 43% до 60%. Результаты нашей работы указывают на то, что использование антигенов *M. tuberculosis*, полученных в дрожжевой системе *P. pastoris*, является перспективным способом для усовершенствования серодиагностических тестов на туберкулез.

### Т037 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГОСПИТАЛЬНЫХ ШТАММОВ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

Н.И. Еремеева, М.А. Кравченко, В.В. Канишев, К.В. Белоусова, Т.В. Умпелева

Уральский НИИ фтизиопульмонологии, Екатеринбург, Россия

В ходе санитарно-бактериологического контроля над наличием возбудителя туберкулеза на поверхностях объектов противотуберкулезного стационара было получено 15 культур микобактерий туберкулеза (МБТ). Наиболее интенсивный уровень контаминации жизнеспособными МБТ отмечен на дверных ручках и поверхностях полов. Далее в убывающем порядке располагаются обувь персонала и пациентов, уборочный инвентарь, поверхности мебели и руки пациентов.

Результаты определения лекарственной чувствительности методом абсолютных концентраций позволили установить, что все культуры, выделенные с поверхностей, устойчивы к противотуберкулезным препаратам I ряда, канамицину и капреомицину; 8 культур устойчивы к офлоксацину. Несмотря на то, что 4 культуры фенотипически проявили чувствительность к офлоксацину, с помощью тест-системы «ТБ Биочип (MDR)» удалось выявить мутации устойчивости к этому препарату.

Результаты MIRU-VNTR-типирования позволили определить, что 9 культур МБТ представляют генотип Beijing, в 4-х пробах обнаружена смесь генотипов Beijing и Ural, что свидетельствует о перекрестной контаминации объектов МБТ.

Для установления наличия вирулентности культурами госпитальных штаммов МБТ были заражены

беспородные морские свинки. Спустя 2 месяца при вскрытии на внутренних органах морских свинок обнаружены очаги поражения. Гистологическое исследование подтвердило наличие генерализованного туберкулеза.

Культуры МБТ были подвергнуты воздействию туберкулоцидных растворов дезсредства «Лизарин», которое использовалось в этом учреждении для текущей дезинфекции. После воздействия 0,5% р-ра (45 мин воздействия), 1,0% р-ра (45, 60 и 90 мин воздействия) и 2,0% р-ра (10 мин воздействия) был обнаружен сплошной рост МБТ (более 100 КОЕ) всех изолятов, выделенных с поверхностей.

Таким образом, на поверхностях объектов производственной среды противотуберкулезного стационара сконцентрированы штаммы микобактерий туберкулеза, принадлежащие, преимущественно генетическому семейству Beijing, с множественной и широкой лекарственной устойчивостью, с устойчивостью к дезинфектантам, сохраняющие вирулентность и способность вызывать патологический процесс у восприимчивых макроорганизмов.

### Т038 ВОПРОСЫ ФАГОРЕЗИСТЕНТНОСТИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ ЛИЦ С ДИСБИОТИЧЕСКИМ СОСТОЯНИЕМ ТОЛСТОГО ОТДЕЛА КИШЕЧНИКА

Е.Ф. Завгородняя, Л.А. Сташкевич

ФГУН «Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии»  
Роспотребнадзора

Регистрируемая в последние годы значительная распространенность дисбиотических нарушений толстого отдела кишечника у взрослых и детей, увеличение количества ассоциативных дисбактериозов и роста в них числа микробов-ассоциантов УПБ диктует необходимость создания не только новых препаратов, действующих на УПБ, но и усовершенствование уже имеющихся. Значительное место среди них занимают бактериофаги, положительно зарекомендовавшие себя при лечении ряда заболеваний. Грамотное применение бактериофагов с учетом надежной предварительной идентификации УПБ и определения их чувствительности к соответствующим бактериофагам способствует эффективному лечению. Однако, в последние годы появились работы, свидетельствующие о все более частой изоляции УПБ, резистентных к бактериофагам.

Цель работы – оценка распространенности фагорезистентности УПБ к лечебным бактериофагам, используемым для первого этапа коррекции микрофлоры кишечника у лиц с дисбактериозом, а также частоты обнаружения у этого же контингента метициллин-резистентных *S. aureus* (MRSA) и определением их чувствительности к соответствующим бактериофагам.

Исследование микрофлоры кишечника и идентификация микроорганизмов проводилась по стандартным методикам. Литическая активность специфических бактериофагов изучалась методом «стерильных пятен» в отношении *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и *oxytoca*, *Proteus vulgaris* и *mirabilis*, *E. coli* (гем+) и (лак-). Использовались соответствующие моно- и поливалентные бактериофаги производства «Микроген» (Н. Новгород и Пермь), а также «Иммунопрепарат» (Уфа). Исследован материал от 993 человек, а также изучены 710 изолированных от них штаммов УПБ.

Установлено наличие дисбиотических нарушений различной степени у 92,8% лиц, у 76,9% из которых дисбактериоз был обусловлен увеличением УПБ, а у 72,6% — был выявлен ассоциативный дисбактериоз. Монокультуры УПБ наиболее часто были представлены *S. aureus*, а микробные ассоциации — *S. aureus* + *Klebsiella pneumonia* или *oxytoca*. Наибольшее выделение фагорезистентных штаммов отмечалось среди *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumonia* и *S. aureus* (53,3, 47,9, 41,3 и 32,6% соответственно), наименьшее — у *E.coli* (гем+) и (лак-) — 13,3 и 12,0%. Штаммы большинства исследованных видов УПБ, кроме представителей рода *Klebsiella*, были высокорезистентными к использованным в работе поливалентным бактериофагам («Секста» и пробиотическому бактериофагу «Комплексный»), тогда как в отношении соответствующих монофагов у них установлена меньшая резистентность. Более частое выделение высокорезистентных штаммов наблюдалось из микробных ассоциаций, превышая в 2–7 раз частоту их изоляции из монокультур. Далее показано, что 10,9% штаммов золотистого стафилококка относились к MRSA. В 96,7% случаев эти штаммы изолированы от детей 1 мес.—2 лет и в 93,5% были устойчивы к соответствующим бактериофагам.

Таким образом, выявлена значительная распространенность фагорезистентных штаммов у лиц с дисбактериозом кишечника, что свидетельствует о необходимости обязательного определения их чувствительности к бактериофагам для решения вопроса о возможности фаготерапии; при этом следует учитывать более высокий уровень резистентности УПБ к поливалентным бактериофагам, а также значительное выделение подобных штаммов из микробных ассоциаций.

### ТОЗР ТРОЙНАЯ УГРОЗА: ВИЧ-ИНФЕКЦИЯ, ТУБЕРКУЛЕЗ И МНОЖЕСТВЕННАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ

З.М. Загдын, В.Б. Галкин

ФГБУ Санкт-Петербургский НИИ Фтизиопульмонологии

**Введение:** В последние годы ведущие роли в сохранении неблагоприятной эпидемической обстановки по туберкулезу (ТБ) в России принадлежат ВИЧ-инфекции и множественной лекарственной устойчивости *Mycobacterium Tuberculosis* (МЛУ МБТ). При общей тенденции к снижению заболеваемости и смертности от туберкулеза в стране растут количество больных с МЛУ ТБ и число случаев сочетанной патологии. Заболеваемость туберкулезом в РФ снизилась с 82,6 до 63,0, смертность от туберкулеза — с 16,8 до 11,4 на 100 тыс. соответственно в 2009 и 2013 гг. При этом удельный вес МЛУ ТБ среди охваченных тестом на лекарственную чувствительность впервые выявленных больных туберкулезом органов дыхания вырос с 15,7% до 21,4% и количество больных с сочетанием туберкулеза и ВИЧ-инфекции — с 274253 до 33894 человек соответственно в 2009 и 2013 гг. Распространение МЛУ ТБ среди больных ВИЧ-инфекцией в крупном эпидемиологическом масштабе не оценивалось.

**Целью исследования** явилось изучение динамики резервуара МЛУ ТБ среди ВИЧ-серопозитивных по отношению к ВИЧ-серонегативным пациентам на территории Северо-Западного федерального округа (СЗФО).

**Методы исследования:** Проведен сравнительный анализ динамических составляющих среди больных туберкулезом с МЛУ МБТ без ВИЧ-инфекции (3023) и с сочетанием ВИЧ-инфекции (267) по данным ежегодной государственной отчетной формы № 33 «Сведения о больных туберкулезом» в девяти территориях Северо-Западного федерального округа за 2013 год. Информация о пациентах с сочетанной патологией ВИЧ/ТБ получена из территорий по запросу лаборатории мониторинга туберкулеза СПб НИИФ.

**Результаты:** В СЗФО на фоне явного снижения показателя распространенности туберкулеза с бактериовыделением без МЛУ, отмечается тенденция к стабилизации распространенности заболевания с выделением лекарственно-устойчивых штаммов МБТ (рис. 1).

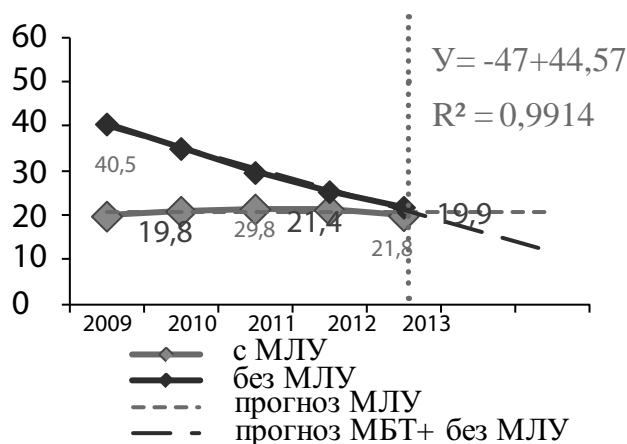


Рисунок 1. Распространенность туберкулеза с бактериовыделением в СЗФО (ф. 33. на 100 тыс.)

Резервуар ВИЧ-негативных пациентов с МЛУ ТБ (3023) составил 70,2% от всех состоявших на диспансерном учете бактериовыделителей. В течение года к этой группе прибавилось: впервые выявленные случаи (13,2%), прибывшие (6,6%), с прогрессированием туберкулеза с развитием МЛУ МБТ (5,0%). Бактериовыделение прекратилось у 21,3%, умерли — 11,7%, в том числе от туберкулеза — 7,6%. К концу года резервуар уменьшился на 7,8%.

Резервуар ВИЧ-позитивных пациентов с МЛУ ТБ (267) составил 52,4% от состоящих на диспансерном учете больных. В течение года среди них удельный вес новых случаев составил 23,2%, прибывших — 10,9%, прогрессирования — 5,6%. Прекращение бактериовыделения отмечено у 10,1%, умерших от туберкулеза — 2,2%, от других причин — 16,9%, к концу года этот резервуар увеличился на 16,1%. Все указанные характеристики имели статистически значимые различия в сравниваемых группах пациентов ( $p < 0.01$ ).

**Заключение:** Резервуар ВИЧ-позитивных бактериовыделителей с МЛУ ТБ в территориях Северо-Запада России растет преимущественно за счет увеличения новых случаев и низкой эффективности лечения таких больных. Тогда как резервуар ВИЧ-негативных лиц с МЛУ ТБ уменьшается преимущественно из-за эффективного лечения. ВИЧ-инфекция усиливает распространение МЛУ ТБ на Северо-Западе России.

#### **T040 ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ФАГОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ РОТОГЛОТКИ И КИШЕЧНИКА У ЧАСТО И ЭПИЗОДИЧЕСКИ БОЛЕЮЩИХ ДЕТЕЙ**

А.М. Затевалов<sup>1</sup>, С.С. Афанасьев<sup>1</sup>, Е.П. Селькова<sup>1</sup>, А.В. Алешкин<sup>1</sup>, Е.А. Воропаева<sup>1</sup>, И.А. Киселева<sup>1</sup>, Л.В. Феклисова<sup>2</sup>, Е.Р. Мескина<sup>2</sup>, Е.А. Медведева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора  
<sup>2</sup>ГБУЗ МО «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирова»

**Цель работы:** Определить наиболее значимые критерии фагочувствительности микроорганизмов для характеристики устойчивости микробиоценозов кишечника и ротоглотки при антибиотико и противовирусной терапии пациентов с острыми респираторными заболеваниями вирусной, бактериальной и смешанной этиологии.

**Материалы и методы:** изучено состояние микробиоценоза кишечника и ротоглотки микробиологическим и биохимическим методом у 60 пациентов с ОРЗ, а так же у 30 пациентов группы сравнения и выделены подгруппы с чувствительными и резистентными микроорганизмами в кишечнике к стрептококковому (St+ и St-) и колиротейному (Kp+ и Kp-) фагам.

**Результаты:** Установлено, что 20% пациентов с вирусной этиологией имеют микрофлору Kp+, и не встречается пациентов с микрофлорой Kp-. Напротив, 33% пациентов с бактериальной этиологией имеют микрофлору Kp- и не встречается Kp+. Чувствительность к стрептококковому бактериофагу обратная:

Суммарный общий уровень ЛЖК и масляной кислоты в кале снижен во всех группах кроме групп с Kp- и St-.

Количество и встречаемость нормофлоры кишечника во всех исследуемых группах практически не менялось, а количество представителей УПМ на один анализ снизилось, кроме группы Kp- и St-. В аналогичном исследовании микрофлоры ротоглотки в тех же группах показало резкое снижение встречаемости нормофлоры, и рост УПМ в 2 – 3 раза во всех группах, кроме Kp-.

Для оценки динамики дисбиотических изменений исследовали зависимость процента встречаемости пациентов групп Kp-, Kp+, St-, St+ от концентрации масляной кислоты в кале. Исследования динамики микробиоценоза после лечения показали отсутствие зависимости встречаемости пациентов от концентрации масляной кислоты в кале во всех группах, кроме Kp-.

**Выводы:** Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что фагочувствительность может использоваться в качестве критерия оценки состояния микробиоценоза. Представители кишечной микрофлоры Kp- могут быть индикатором устойчивого нормобиоценоза кишечника, обладающего высоким защитным собственным потенциалом и способностью влиять на защитный потенциал микробиоценоза ротоглотки.

#### **T041 СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ОТДЕЛЬНЫХ ДОМЕНОВ БЕЛКОВ НОС БАКТЕРИОФАГОВ ПОДСЕМЕЙСТВА TEEQUATROVIRINAE**

А.А. Зимин<sup>1</sup>, Г.В. Микулинская<sup>2</sup>, Л.Ф. Нигматуллина<sup>1</sup>, Н.Н. Назипова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ИБФМ РАН, г. Пушкино, Московская обл., Россия

<sup>2</sup>ФИБХ РАН, г. Пушкино, Московская обл., Россия

<sup>3</sup>ИМПБ РАН, г. Пушкино, Московская обл., Россия

Белок Нос является наружным капсидным белком и присоединяется к центру капсомера, образо-

ванного белком 23. Белок Нос – основной антиген бактериофага Т4. Анализ последовательности белка Нос бактериофага Т4 показал, что он состоит из четырех tandemных иммуноглобулинподобных доменов. Белки Нос различных бактериофагов, родственных Т4, очень гетерогенны по длине и могут содержать разное число доменов, сходных по аминокислотной последовательности и по структуре. Природа гетерогенности белков Нос, а также собственно происхождение белков может быть исследовано путем сравнительного анализа аминокислотных последовательностей отдельных доменов. Такое исследование также может пролить свет на пути эволюции как белков Нос, так и других белков, содержащих повторяющиеся иммуноглобулинподобные домены.

На основании ныне существующих данных белки Нос можно разделить на 6 групп:

Группа I: 1-доменные белки Нос

Группа II: 2-доменные белки Нос

Группа III: 3-доменные белки Нос

Группа IV: 4-доменные белки Нос

Группа V: 4-доменные белки Нос с С-концевым удлинением третьего домена

Группа VI: 5-доменные белки Нос

Филогенетическое древо отдельных доменов в белках – продуктах генов нос бактериофагов, родственных Т4, образует три основные ветви. Это ветвь С-концевых доменов, ветвь N-концевых доменов и ветвь промежуточных доменов.

Обязательное присутствие С-концевого домена во всех белках Нос указывает на его функциональную и структурную значимость для формирования белка. Сходство этого домена с адгезивными белками – селектинами и наличие в нем консервативной белковой последовательности ESRNG также косвенно свидетельствует о его участии в присоединении к капсиду.

Сравнительный анализ доменной организации Нос позволяет выделить три возможных пути эволюции его генов: а) внутригенная дупликация промежуточных доменов, б) перемешивание доменов при рекомбинации между генами нос различных родственных фагов и в) дупликация гена двухдоменного варианта белка Нос.

Работа была поддержана грантом РФФИ 14-04-00991а.

#### **T042 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА ENTNEROBACTERIACEAE**

С.Н. Золотухин

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

Всесторонние исследования по изучению бактериофагов, выполненные за последние 40–45 лет, позволили широко использовать их для решения многих задач в микробиологии, вирусологии, генетике, биохимии, иммунологии, радиобиологии, биотехнологии и других областях биологических исследований. Поэтому учение о фагах, развивающееся вначале как узкая область медицинской и ветеринарной микробиологии, в настоящее время приобрела общебиологическое значение.

Кафедра микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы УГСХА определила одно из приоритетных научных направлений – выделение и изучение бактериофагов малоизвестных в ветеринарной практике микроорганизмов. На кафедре более тридцати лет прово-

даться научно-исследовательская работа по этой проблеме, в частности, изучение бактериофагов ранее малоизвестных в ветеринарии патогенных энтеробактерий — возбудителей желудочно-кишечных заболеваний молодняка животных и пищевых токсикоинфекций человека.

В конце прошлого, начале текущего столетия из объектов внешней среды были выделены и селекционированы новые штаммы фагов активные в отношении бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Providencia*, *Yersinia*, *Hafnia*, которые лишь недавно получили официальное признание возбудителей болезни животных.

У выделенных штаммов были изучены биологические свойства: литическая активность, форма и размер негативных колоний, морфология фаговых корпускул, структура и размер нуклеиновой кислоты, показатели одиночного цикла внутриклеточного развития, устойчивость к высокой температуре и действию хлороформа, специфичность, диапазон литической активности, изменение литической активности при хранении.

Штаммы с более выраженными биологическими свойствами были использованы для разработки параметров и схем фагоиндикации и фагоидентификации гомологичных фагам бактерий.

Проведенные эксперименты позволяют использовать отобранные изоляты фагов с диагностической целью.

#### **Т043 ФАГ-ОПОСРЕДОВАННЫЙ БИОПРОЦЕССИНГ ГИДРОБИОНТОВ**

Э.Р. Зулкарнеев<sup>1,3</sup>, И.А. Киселева<sup>1,2</sup>, О.Г. Ефимова<sup>1</sup>,  
А.В. Алешкин<sup>1,2</sup>, С.С. Афанасьев<sup>1</sup>, В.А. Алешкин<sup>1</sup>,  
Х.М. Галимзянов<sup>3</sup>, О.В. Рубальский<sup>3</sup>, М.В. Лозовская<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ООО «БиФаг», Москва, Россия;

<sup>3</sup>ГБОУ ВПО АГМА, Астрахань, Россия;

<sup>4</sup>ФГБОУ ВПО «АГУ», Астрахань, Россия

Качество рыбных продуктов определяется соблюдением санитарно-гигиенических правил при ловле, транспортировке, хранении и технологической переработке гидробионтов. Микробиологическая загрязненность охлажденной рыбы наносит не только значительный экономический ущерб производителю, вызывая порчу готовой продукции, но и может инициировать возникновение широкого спектра инфекционных заболеваний бактериальной этиологии у населения, включая листериоз, сальмонеллез, аэромоназ, ботулизм и другие. Метод биодеконтаминации, фаг-опосредованный биопроцессинг, безопасен для человека и не влияет на физические и органолептические свойства обработанного продукта. Данное исследование посвящено отработке бактериофаговой деконтаминации охлажденной морской рыбы, искусственно контаминированной *Listeria monocytogenes* в клинически значимом для человека титре.

Стерилизованные 70% спиртом, а затем отмытые в стерильном физиологическом растворе контрольные и опытные образцы приобретенной в торговой сети охлажденной морской рыбы (куски, содержащие мышечные волокна с чешуей, весом  $5 \pm 0,5$  г) были искусственно контаминированы при комнатной температуре в течение часа 5 мл суспензии *L. monocytogenes*, содержащей  $10^6$  КОЕ/мл. После чего опытные образцы погрузили в емкости с 5 мл стерильного фильтрата листериозного фаголизата Lm1 с

титром  $10^9$  БОЕ/мл. Контрольные куски рыбы поместили в контейнеры с физиологическим раствором такого же объема. Опытные и контрольные образцы деконтаминировались при температуре  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 24 ч. Затем оценивали количество бактериальных клеток на образцах путем посева 0,1 мл суспензии, в которой они хранились, на хромогенный агар Уриселект 4. Уровень листерий в опытной группе относительно контрольной снижался более чем на 99%, составляя в среднем не более 50 КОЕ/мл, в то время как количество бактериальных клеток в контрольных образцах превышало  $1,5 \times 10^4$  КОЕ/мл.

Проведенное исследование подтверждает возможность существенного снижения уровня контаминации *Listeria monocytogenes* охлажденной рыбы в срок, не превышающий 24 ч. Использование нового метода биодеконтаминации гидробионтов — фаг-опосредованного биопроцессинга — полностью сохраняет экологическую чистоту, пищевую ценность и органолептические свойства рыбы.

#### **Т044 ФАГМИДНЫЙ ВЕКТОР ДЛЯ ДИСПЛЕЯ ФРАГМЕНТОВ АНТИТЕЛ ЧЕЛОВЕКА ПРОТИВ ОРТОПОКСВИРУСОВ**

К.А. Иванова, Д.В. Шаньшин, Д.Н. Шербаков,  
А.А. Сергеев

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», р.п. Кольцово, Россия

Сконструирован фагмидный вектор для дисплея фрагментов антител человека против ортопоксвирусов. Для этого была рассчитана ДНК-кассета, кодирующая элементы для встройки и экспрессии переменных доменов антител. Из фагомиды рBluescript II SK + были удалены сайты рестрикции, препятствующие клонированию целевых ДНК. С использованием олигонуклеотид-направленного мутагенеза в вектор была встроена нуклеотидная последовательность, включающая сайт для эндонуклеазы рестрикции Age I. ДНК-кассета была синтезирована с помощью химических методов и встроена по сайту Sal I и сайту, введенному мутагенезом.

Для оценки правильности сборки комплекса переменных фрагментов тяжелой и легкой цепей антитела на поверхности фаговой частицы был использован рекомбинантный белок вируса осповацины H3L. Было показано, что созданная векторная система обеспечивает получение бактериофагов, экспонирующих на своей поверхности переменные фрагменты антител против белка H3L.

#### **Т045 БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ И ФАГИ**

С.Г. Игнатов<sup>1,2</sup>, А.Г. Волошин<sup>1</sup>, Г.Н. Федюкина<sup>1</sup>,  
Е.А. Ганина<sup>1</sup>, В.В. Мочалов<sup>1</sup>, Е.А. Денисенко<sup>1</sup>,  
О.Н. Перовская<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk, Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Геологический факультет, Москва, Россия

Бактериальные биопленки — это классическая форма существования микроорганизмов в естественных условиях. Такая форма существования бактерий обуславливает наибольшую устойчивость клеток к неблагоприятным воздействиям и увеличивает возможности их дальнейшей экспансии. Классический механизм образования биопленок описывается как прикрепление единичных клеток

к поверхности, с последующим ростом бактерий, завершающимся образованием биопленки. На примере клеток *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* описывается наиболее вероятный механизм образования бактериальных биопленок. Установлено, что бактериофаги препятствуют начальной стадии образования биопленок, сразу же после специфической адсорбции на поверхности клеток. Предполагается, что основным механизмом действия является нарушение клеточного барьера и целостности цитоплазматической мембраны, приводящее к существенному снижению трансмембранного потенциала.

#### **T046 ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ МИКРОФЛОРЫ ПОЛОСТИ НОСА И ГЛОТКИ У ДОБРОВОЛЬЦЕВ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ, ИМИТИРУЮЩИХ ИЗМЕНЁННЫЕ УСЛОВИЯ ОБИТАНИЯ**

**В.К. Ильин, Н.В. Кирюхина, Ю.А. Морозова**

ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

В экстремальных условиях нарушаются барьерные функции организма, связанные с нормальным функционированием кожи, кишечника и слизистых оболочек, непосредственно контактирующих с окружающей средой. Результаты обследования космонавтов, водолазов, спортсменов выявили признаки развития вторичного иммунодефицита и нарушения регуляторных механизмов, причём реакция каждого индивида зависела от его генетического и иммунологического потенциала, а также от состояния микробиоценоза. Синдром нарушения колонизационной резистентности развивается практически во всех случаях использования человеком искусственно измененной среды обитания. Многочисленные исследования показали, что тактика использования антисептических и антибактериальных агентов для коррекции микрофлоры человека нежелательна в условиях изменённой среды обитания, так как она может привести к дисбиотическим сдвигам в организме хозяина, изменению лекарственной чувствительности и формированию факторов агрессии у представителей микрофлоры и, таким образом, спровоцировать инфекционный процесс. Данные обстоятельства диктуют поиск альтернативных методов нормализации микробного баланса.

Целью исследования явилось изучение эффективности двух бактериальных препаратов: назального спрея, содержащего штамм *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* 090104 из коллекции ГИСК им. Тарасевича и фарингеального спрея, содержащего коммерческий пробиотический штамм, предназначенный для коррекции микрофлоры орофарингеальной области *Streptococcus salivarius* K12. Эффективность препаратов оценивалась в нескольких модельных экспериментах с участием человека («сухая» иммерсия, изоляция, гипербарические условия). Применялись различные схемы применения препаратов. Во всех случаях использования методики был зафиксирован однозначный ингибирующий эффект воздействия *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* 090104 в отношении *Staphylococcus aureus*, что открывает перспективу использования непатогенных коринебактерий в качестве назального пробиотика.

Применение фарингеального спрея предотвращало рост условно-патогенной микрофлоры глотки. Использование обоих препаратов сопровождалось стимуляцией протективной микрофлоры в полости носа и глотки.

#### **T047 ПРИНЦИПЫ ФОРМИРОВАНИЯ ЭЛЕКТРОННОЙ БАЗЫ ДАННЫХ КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ КОСМОНАВТОВ**

**В.К. Ильин, З.О. Соловьева, М.А. Скедина**

ГНЦ РФ-ИМБП РАН, Москва, Россия

Факторы длительного космического полета, понижающие жизнедеятельность организма человека, нарушают и бактериальное равновесие нормальной микрофлоры.

Создание электронной базы данных кишечной микрофлоры и покровных тканей космонавтов необходимо для определения их микробного статуса с целью раннего выявления дисбиотических сдвигов и снижения риска развития воспалительных заболеваний.

Создание электронной базы осуществляется при помощи системы автоматизированного анализа изображений микробных объектов.

Система автоматизированного анализа изображений микробных объектов была создана для решения проблемы оперативного контроля за состоянием микрофлоры и определения микробного статуса человека с целью раннего выявления дисбиотических сдвигов и снижения риска развития воспалительных заболеваний. Работа системы построена на принципе цифровой микроскопии окрашенных по Граму препаратов нативных мазков, взятых из различных биотопов человека, и автоматическом распознавании на полученном изображении микробных объектов по предварительно заданным характеристикам.

При исследовании микробиоценоза кишечника человека разработана методика приготовления препаратов для автоматизированного анализа. Эта методика применена при исследовании кишечной микрофлоры участников экспедиций на Международную космическую станцию и их дублеров. При изучении количественного состава кишечной микрофлоры обследуемых учитывались количество грамположительных кокков, грамотрицательных кокков, грамотрицательных палочек, грамположительных палочек. Определение видового состава в каждой группе проводилось с помощью тест-систем.

Формирование электронной базы данных кишечной микрофлоры основывается на следующих принципах: создания представительной выборки изображений микроорганизмов; представления результатов анализа в виде тинкториальных групп микроорганизмов; представления результатов анализа в виде соотношения групп микроорганизмов.

Такое представление результатов даст возможность:

- оценить изменения кишечной микрофлоры космонавта во время одного полета;
- персонального ведения космонавта по участию в полетах;
- при необходимости провести специальные мероприятия по стабилизации кишечной микрофлоры космонавта и повышения колонизационной резистентности.

## **Т048 МИГРАНТЫ И ТУБЕРКУЛЕЗ — ВНЕШНИЙ ФАКТОР ЭКОЛОГИИ**

**Н.Ю. Исаева**

*ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России*

Согласно Стратегии национальной безопасности РФ, ТБ будет оставаться одной из десяти ведущих причин заболеваемости вплоть до 2020 г. Заболеваемость ТБ в России в 2013 г. составляла 63, а смертность — чуть более 11 случаев на 100 тыс. россиян. За последний год смертность от ТБ снизилась более чем на 8%, а заболеваемость — на 7,5%, однако Россия по-прежнему входит в число 22 стран с высоким бременем туберкулеза, на которые приходится порядка 80% всех случаев туберкулеза в мире, растет число больных с лекарственно устойчивыми формами возбудителя ТБ.

Больные ТБ чаще выявляются в социальных группах риска, сопротивляемость человека инфекциям снижается с ростом стрессовых ситуаций. Ухудшение экологии, локальные этнические конфликты, массовые миграции населения создают условия для широкого инфицирования наиболее вирулентными штаммами микобактерий (МБТ). Повышение агрессивности МБТ способствует возникновению туберкулезных поражений у генетически более устойчивых лиц. Эпидемиология ТБ связана с интенсивностью миграционных процессов, сопровождающихся ухудшением качества экосистемы, социально-экономических, психологических характеристик жизни. В Российской Федерации в 2013 г. въехало 17,7 млн человек, большинство которых — из стран СНГ, в том числе, 12,4 млн приехали работать, из них до 60% работают нелегально. Число лиц, являющихся жителями других территорий, у которых был выявлен туберкулез, в Санкт-Петербурге за 5 лет возросло на 1089,5%, более чем в 10 раз увеличилась доля иностранных граждан среди впервые выявленных больных. Основные проблемы мигрантов — плохое знание русского языка, погружение в иную социальную среду и культуру, резкая смена климата, отрыв от родственников и семьи, оказывают на человека стрессующее воздействие, приводящее к снижению факторов иммунной защиты. Развитие ТБ в подобных условиях становится более вероятным. Очаги ТБ, образованные мигрантами, представляют собой коммунальные квартиры или общежития, степень риска распространения туберкулеза в них более высокая. Процент привлечения к обследованию контактных лиц очень низок.

Возрастающие потоки миграции населения сопровождаются появлением новых рисков для экологического, санитарного и эпидемического благополучия и здоровья жителей Санкт-Петербурга. Для защиты населения и минимизации этих рисков необходимо принятие решений на государственном и муниципальном уровне, обеспечивающих проведение полноценного курса лечения ТБ всем больным, независимо от их статуса.

## **Т049 СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ ПОСЛЕДНЕГО ПОКОЛЕНИЯ И БАКТЕРИОФАГОВ НА КОРРОЗИЮ МЕТАЛЛОВ, ВЫЗЫВАЕМУЮ *DESULFOVIBRIO DESULFURICANS***

**Н.Н. Карамышева, Д.А. Васильев, А.В. Морозов,  
А.Л. Игнатов, С.К. Львов**

*ФГБОУ ВПО УГСХА им. П.А. Столыпина, Ульяновск, Россия*

Одной из основных проблем в нефтяной промышленности является ускоренная коррозия до-

рогостоящего нефтедобывающего оборудования, обусловленная высоким содержанием в нефтяных пластах сульфатредуцирующих бактерий. Для борьбы с этим процессом нефтяники закачивают в пласт ингибиторы, в основном это бактерициды, относящиеся к классам неорганических и органических соединений.

В результате проведения научных исследований по указанной теме НИР был создан биопрепарат, состоящий из бактериофагов с высокой степенью литической активности ( $10^8$ ), для защиты и предупреждения коррозии металла в нефтяной и нефтеперерабатывающей промышленности.

Целью нашего исследования было сравнение действия химических ингибиторов последнего поколения и биопрепарата на основе бактериофагов сульфатредуцирующих бактерий, полученного в ходе экспериментов на кафедре МВЭ и ВСЭ Ульяновской сельскохозяйственной академии на степень коррозии металла.

В работе был использован метод металлографической оценки коррозионных поражений поверхности металла, позволяющий определить тип коррозии, распределение коррозионного поражения в металлах с помощью сравнения с соответствующими типовыми формами, а также измерения глубины коррозионного поражения на металлографическом шлифе.

В результате сравнения действия химического ингибитора и биопрепарата на основе бактериофагов на степень защиты металлических поверхностей было выявлено:

— поверхность насосно-компрессорных труб, используемых в нефтедобывающей промышленности, подвергается двум видам коррозии — равномерной и неравномерной;

— введение биопрепарата на основе бактериофагов в нефтеводную среду, содержащую *D. desulfuricans* приводит к снижению неравномерной коррозии на 94,4%;

— введение в нефтеводную среду, содержащую СРБ ингибитора, приводит к снижению неравномерной коррозии на 84,90%;

— биопрепарат на основе бактериофагов подавляет активность СРБ вида *Desulfovibrio desulfuricans*, и является экологически чистым, что выгодно отличает его от повсеместно применяемых бактерицидов.

## **Т050 ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭТИОЛОГИИ**

**Л.В. Катаева, А.А. Вакарина, Л.А. Бычкова,  
Т.Ф. Степанова**

*ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора, Тюмень*

Актуальность проблемы острых кишечных инфекций (ОКИ) бактериальной этиологии на сегодняшний день связана не только с их высокой распространенностью, но и с частотой неблагоприятных последствий в исходе заболевания. Даже легкие формы ОКИ способствуют развитию заболеваний ЖКТ. Известно, что основными этиологическими агентами бактериальных ОКИ являются бактерии семейства Enterobacteriaceae: рода *Salmonella*, энтеропатогенные кишечные палочки (ЭПКП), лактозонегативные *E. coli*, бактерии родов *Klebsiella*, *Proteus*. Вследствие повышения устойчивости условно-пато-

генных бактерий к антибактериальным препаратам хорошие перспективы в качестве антимикробной терапии имеют бактериофаги. Целью настоящего исследования явилось изучение чувствительности наиболее этиологически значимых возбудителей ОКИ к некоторым бактериофагам и оценка возможности применения их для лечения воспалительных процессов ЖКТ.

На чувствительность к сальмонеллезному бактериофагу исследовано 184 штамма сальмонелл 18 серологических вариантов, серогрупп В, С<sub>1</sub>, С<sub>2</sub>, С<sub>3</sub>, D<sub>1</sub>, E<sub>1</sub>. Все культуры показали высокую чувствительность к указанному бактериофагу. В группе ЭПКП исследовано 137 штаммов, принадлежащих к 21 серогруппам. По частоте обнаружения на первом месте были ЭПКП серогруппы O:25, на втором месте O:144, затем O:151, O:1, O:26. Более 60 % штаммов ЭПКП были чувствительны к колипротейному фагу и около 80 % к пиобактериофагу. Наиболее выраженная литическая активность колипротейного бактериофага отмечалась у штаммов серогрупп O:25, O:151, O:1, O:26 - более 70 % случаев. В 50 % случаев E. coli (lac -) были чувствительными к колипротейному бактериофагу и около 70 % штаммов - чувствительны к пиобактериофагу. Бактерии родов *Klebsiella*, *Proteus* также показали более высокую чувствительность к пиобактериофагу (35 и 43,5 % соответственно) при сравнении с бактериофагом клебсиелл поливалентным и коли-протейным.

Таким образом, результаты исследования показали высокую литическую активность монобактериофага сальмонеллезного, пиобактериофага в отношении ЭПКП и E. coli (lac -). Поэтому фаготерапия должна быть рекомендована для лечения ОКИ бактериальной этиологии, но с обязательным проведением определением чувствительности штаммов к бактериофагам.

#### **T051 ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ БИОПЛЁНОК ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ**

**О.Д. Кирилова, Н.А. Селянская, С.В. Титова, Л.М. Веркина**

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия*

Основной формой существования *Vibrio cholerae* в естественных условиях являются биоплёнки, в составе вибрионы более устойчивы к неблагоприятным факторам.

**Цель работы:** оценить антибиотикочувствительность *V. cholerae* в составе биоплёнки на разных стадиях её формирования.

Материалы и методы. Штаммы *V. cholerae* El Tor и non O1/ non O139, выделенные от людей (ctx<sup>+</sup>, tcp<sup>+</sup>). Антибактериальные препараты: левомецетин, доксициклин, гентамицин, рекомендованные для лечения холеры (МУК 3.4.2552-09), в концентрациях 1,0-8,0 мг/л, соответствующих чувствительности или промежуточной устойчивости (МУК 4.2.2495-09).

В пенициллиновые флаконы, содержащие пластиковые пластины для получения биоплёнок, добавляли по 5 мл кипячёной водопроводной воды и суспензию *V. cholerae* n×10<sup>4</sup>м.кл. Для изучения чувствительности биоплёнок к антибиотикам на стадии формирования во флаконы одновременно с суспензией вносили антибиотики. Для изучения антибиотикочувствительности зрелых биоплёнок антибиотики во фла-

коны добавляли через 4 суток после внесения суспензии *V. cholerae*. В контрольные флакон антибиотика не добавляли. После выдерживания в течение 24 часов при 37°C делали высеивание планктонной и биоплёночной культур на агар Мартена. Результат учитывали через 24 часа по наличию или отсутствию роста холерных вибрионов.

**Результаты.** При изучении антибиотикочувствительности биоплёнок на стадии формирования при высеивании на агар наблюдали рост биоплёночной формы *V. cholerae* El Tor при воздействии всех концентраций антибиотиков, а *V. cholerae* non O1/ non O139 - 1-2 мг/л при отсутствии роста планктона. При воздействии антибиотиками на зрелые биоплёнки наблюдали гибель планктона *V. cholerae* El Tor при концентрациях гентамицина, левомецетина 2-8 мг/л, доксициклина - 4 мг/л и *V. cholerae* non O1/ non O139 на всех концентрациях. Биоплёнки сохраняли жизнеспособность. В контроле был рост и биоплёнок и планктона в обоих случаях.

**Заключение.** Чувствительность к некоторым антибактериальным препаратам *V. cholerae* в планктонной форме и в виде биоплёнок различается, что требует проведения оценки активности антибактериальных препаратов в отношении биоплёнок для повышения эффективности рациональной антибиотикотерапии.

#### **T052 АКЦЕПТИВНЫЙ ИММУНИТЕТ – ОСНОВА СИМБИОТИЧЕСКИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ**

**Е.П. Киселева**

*ФГБУ НИИЭМ СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия*

Традиционно взаимоотношения иммунной системы макроорганизма с комменсалами принято рассматривать с точки зрения протективного иммунитета, отвечающего за защиту от патогенов. В то же время, функции иммунной системы по обеспечению проживания чужеродных микроорганизмов на поверхности кожи и слизистых значительно отличаются от протективного иммунитета. Было предложено выделить иммунный ответ в отношении нормальной микробиоты в отдельную функцию иммунитета и назвать её акцептивной (В.Б. Климович, 2002). Взаимодействие с симбионтными бактериями, в отличие от патогенов, является физиологическим процессом. Между комменсалами и клетками иммунной системы отсутствует прямой контакт, поскольку они разделены слоем эпителиальных клеток. Основной стратегией иммунного ответа в борьбе с инфекцией является распознавание своего и чужого с последующей элиминацией патогена, в при взаимодействии с симбионтами это же распознавание приводит к мирному сожительству с бактериями. Иммунный ответ направлен на сохранение и поддержание микробного биоценоза, а также передачу потомству. Эти задачи реализуются как на уровне врожденного, так и приобретенного иммунитета. Ключевым этапом является распознавание клетками иммунной системы микробных сигналов, поступающих через эпителий, с помощью паттерн-распознающих рецепторов. В результате клетки эпителии под контролем иммунной системы синтезируют слизь, создающую специфическую среду для проживания кишечной микробиоты, а также антибактериальные пептиды для защиты макроорганизма. Главной иммунологической эффекторной молекулой является IgA, который секретируется в просвет кишечника и непосредственно контактирует с бактериями. IgA, в отличие

от IgG и IgM, играющих важную роль в защите от патогенов, не взаимодействует с комплементом и не убивает бактерии. Он выполняет другие функции, участвуя в создании биопленки, а также в контроле за поступлением бактерий через М-клетки. Важную роль играют также Т-регуляторные клетки, отвечающие за создание специфической толерантности к антигенам нормальной микробиоты. Таким образом, акцептивный иммунитет отличается от протективного по многим параметрам, включающих как запуск иммунного ответа, так и его реализацию, происходящую на уровне разных эффекторных молекул.

### **Т053 ИЗМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* ПОД ДЕЙСТВИЕМ δ-ЭНДОТОКСИНОВ *BACILLUS THURINGIENSIS***

**Е.Г. Климентова**

ФГБОУ ВПО УлГУ, Ульяновск, Россия

Известно, что гены ряда белков (δ-эндотоксинов) параспоральных кристаллов различных подвидов бактерии *B. thuringiensis* введены во многие растения для защиты их от вредных насекомых. Такие генномодифицированные растения (Bt-растения) обладают способностью синтезировать во время вегетации большие количества δ-эндотоксинов. Показано, что δ-эндотоксины *B. thuringiensis* обладают выраженной биологической активностью и способны оказывать антибиотическое действие на микроорганизмы — симбионты желудочно-кишечного тракта позвоночных животных и человека. Важнейшее значение симбиотической микробиоты для многих сторон жизнедеятельности животных и человека неоспоримо доказано, поэтому изучение влияния δ-эндотоксинов на свойства бактерий-симбионтов желудочно-кишечного тракта имеет большое значение, особенно — в связи с расширяющимся использованием трансгенных Bt-растений в питании.

Была изучена гетерогенность популяции 130 штаммов культуры *Escherichia coli* выделенных из прямого отдела толстой кишки лабораторных мышей с экспериментальным дисбактериозом, обусловленным длительным пероральным введением δ-эндотоксинов *B. thuringiensis* (дозы 75–100 мг/кг веса животного, которые могут быть получены из пищи, содержащей Bt-растения) по их персистентным и патогенным свойствам, и 49 штаммов, выделенных от интактных животных. С помощью общепринятых методик были изучены антилизоцимная, антикомплемментарная и антиинтерфероновая активности, а также адгезивные свойства, гемолитическая и лактозонегативная активности.

Было установлено, что в микробиоценозе толстого кишечника животных при действии δ-эндотоксинов *B. thuringiensis* происходят дисбиотические изменения, при этом количество гемолитических и лактозонегативных штаммов *E. coli* достоверно увеличивалось по сравнению с микробиотой кишечника интактных животных. Наличие и частота факторов персистенции штаммов *E. coli*, выделенных от животных с экспериментальным дисбактериозом, оказались намного больше, чем у штаммов, выделенных от животных контрольной группы, отличаясь на статистически значимую величину. Наблюдалось резкое нарастание частоты проявления этих показателей в группах лактозонегативных и гемолитических штаммов вплоть до

массового абсолютного (100%) уровня по антилизоцимной и антиинтерфероновой активности. Следует отметить, что особенно часто высокие показатели факторов персистенции проявляли штаммы *E. coli*, выделенные из сложных микробиоценозов в виде ди-, три-, тетра-ассоциантов и прочих вариантов, содержащих такие культуры, как *Klebsiella* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella morganii*, *Yersinia enterocolitica*, дрожжеподобные грибы р. *Candida*, и прочие. В результате проведенных нами исследований также было установлено, что в сложных биоценотипических условиях, обусловленных влиянием δ-эндотоксинов, штаммы эшерихий, обнаруживая персистентные качества, синхронно усиливали патогенность, в частности, адгезивные свойства.

Таким образом, действие высоких доз δ-эндотоксинов *B. thuringiensis* на популяцию культуры *E. coli* в условиях *in vivo* вызвало усиление факторов персистенции, особенно среди лактозонегативных и гемолитических штаммов. Это сопровождалось колонизацией биотопа кишечника макроорганизма-хозяина добавочными и транзитными условно-патогенными видами бактерий и привело к снижению количества представителей нормальной микробиоты. Увеличение содержания условно-патогенных микроорганизмов, в свою очередь, сопровождалось развитием дисбактериоза и подавлением основных гуморальных факторов естественной резистентности макроорганизма.

### **Т054 ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ НА МИКРОБИОТУ КУШЕЧНИКА КРЫС ПРИ ДИСБИОЗЕ**

**К.М. Климина, А.Н. Суворов, Е.И. Ермоленко,  
А.В. Коровкина, С.А. Гладышев, В.Н. Даниленко**

ИОГен РАН, Москва, Россия;

ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

На данный момент особый интерес приобрел анализ микробиологических сообществ кишечника при дисбиозе или других заболеваниях. Один из существующих методов метагеномного анализа — анализ на основе гена 16S рРНК, который позволяет анализировать состав микробиологического сообщества.

В нашей работе основной задачей было исследование лекарственного средства на основе штаммов *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecium*. Проведена оценка влияния данных пробиотических бактерий отдельно и в виде смеси этих микроорганизмов на модели экспериментального дисбиоза кишечника у крыс. Созданы 6 групп крыс, которым вводились по-отдельности пробиотические штаммы *B. longum*, *L. rhamnosus*, *E. faecium*, входящих в состав ЛС; их смесь, в соотношении 1:1:1; антибиотик и контрольная группа, которые получали воду. В ходе пробиотикотерапии дисбиоза выявлены тенденции к более быстрому восстановлению содержания основных представителей облигатной флоры кишечника: лактобацилл, бифидобактерий, энтерококков, эшерихий и «благоприятного маркерного» вида бактерий *Faecalibacterium prausnitzii*. Доказана способность комплекса пробиотических бактерий стимулировать продукцию регуляторного цитокина TGF-β1 и экспрессию противовоспалительного цитокина IL-10.



У всех 6-ти групп крыс отбирались фекалии для их дальнейшего анализа, в частности мультилокусного секвенирования по участку гена 16S рРНК на приборе GS Junior, Roche. Была сделана выборка из 3-х фекалий каждой группы от одного эксперимента и 5 фекалий каждой группы от повторного эксперимента. В общей сложности на каждую группу приходилось по 8 образцов фекалий.

Мультилокусное секвенирование по участку гена 16S рРНК позволило выявить степень биологического разнообразия микробиоты кишечника крыс в зависимости от того, что вводилось той или иной группе крыс. Анализ данных секвенирования проводился по базе данных Ribosomal Database Project (RDP) <http://rdp.cme.msu.edu/>. Биологическое разнообразие микробиоты кишечника крыс анализировалось по видовому и родовому составу бактериальных сообществ.

### **T055 ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ТУБЕРКУЛЕЗОМ НАСЕЛЕНИЯ ЕВРЕЙСКОЙ АВТОНОМНОЙ ОБЛАСТИ**

**Е.О. Клинская**

*ФГБОУ ВПО «Приамурский государственный университет  
имени Шолом-Алейхема, г. Биробиджан, Россия*

Туберкулез – это заболевание мирового и глобального масштабов. В РФ самый низкий показатель заболеваемости туберкулезом был отмечен в 1990 г. – 34 случая на 100 тыс. населения в год. В настоящее время в Европе заболеваемость была 54 случая, а в Израиле, Германии, Италии 5–6 на 100 тыс. населения в год. Наибольшая заболеваемость туберкулезом регистрируется в Индии, КНР и России. На протяжении последних лет Еврейская автономная область (ЕАО) занимает 2-е место в РФ по уровню заболеваемости туберкулезом.

В конце 20-го и начале 21-го столетий, с ростом уровня безработицы, увеличением количества лиц без определенного места жительства, снижением качества медицинского обслуживания в ЕАО выросла заболеваемость населения туберкулезом почти до 200 случаев на 100 тыс. населения в год. В 2012 г. этот показатель в РФ составил чуть больше 68,1 случаев, в то время как в ЕАО он был почти в 2,5 раза выше (171,3). В ДВФО, по данным за 2010 год, заболеваемость была 139,5, в Приморье – 200, в Хабаровском крае – 126, в Амурской области – 145, в ЕАО – 173 случаев на 100 тыс. населения в год.

Сегодня во всех регионах РФ просматривается тенденция к снижению показателей по данному заболеванию. Однако в ЕАО они остаются достаточно высокими (средний показатель за последние 10 лет – 128,3 случаев на 100 тыс. населения в год), а область постоянно входит в пятерку территорий, имеющих наибольший уровень заболеваемости населения туберкулезом. Высокий уровень инфицированности населения.

Заболеваемость туберкулезом у мужчин в автономии в 2 раза выше, чем у женщин, что связано с ведением нездорового образа жизни, наличием вредных привычек и большой, в отличие от женщин, подверженности стрессам. Преимущественно поражаются туберкулезом органы дыхания.

Анализ заболеваемости населения туберкулезом по муниципальным образованиям автономии показал, что особенно она высока в сельскохозяйственных районах – Биробиджанском, Ленинском и Сидовичском и превышает среднеобластной по-

казатель более чем на 50%. Связано это с низким уровнем медицинского обслуживания, санитарной культуры населения, отсутствием профилактической работы, фельдшерских пунктов в некоторых отдаленных поселениях, налаженного регулярного автобусного сообщения. И как следствие, население отдаленных мест не имеет возможности вовремя выехать в административный центр, диагностировать и начать лечение данного заболевания. Больные уклоняются от лечения и болеют целыми семьями. По нашим данным, 70–75% больных (включая инвалидов) из сельской местности, не работают, имеют низкое качество жилья, неполноценное питание (преобладание хлеба и картофеля, ниже среднероссийского показателя потребление молока, мяса и яиц), живут в условиях стресса.

Как известно, риск заболеть возрастает, когда имеются сопутствующие заболевания – диабет, язвенная болезнь желудка, бронхит, гепатит и др. Фактором риска также могут быть и прием различных препаратов, снижающих иммунитет, мутация самой туберкулезной палочки и формирование к ней лекарственной устойчивости, миграция населения.

В настоящее время в автономии необходимо приобрести современное компьютерное лабораторное оборудование, которое сократит срок диагностики (бактериологического анализа) с 4-х месяцев до 3–4 недель.

Таким образом, на территории ЕАО проблема заболеваемости населения туберкулезом стоит достаточно остро и требует дополнительных исследований.

Материалы подготовлены при финансовой поддержке субсидии на выполнение государственного задания Минобрнауки России № 2014/422 ФГБОУ ВПО «ПГУ им. Шолом-Алейхема» по проекту № 485 «Влияние природных и неприводных факторов на состояние здоровья населения Еврейской автономной области».

### **T056 РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ФАГОТИПИРОВАНИЯ ЛИСТЕРИЙ**

**Е.Н. Ковалева, Д.А. Васильев, Е.В. Сульдина**

*ФГБОУ ВПО УГСХА им. П.А. Столыпина, Ульяновск, Россия*

При возникновении вспышек листериозной инфекции связанных с потреблением пищевых продуктов, прежде всего, сыра, других молочных продуктов, салатов, фруктов в меньшей степени – мясных, куриных и рыбных изделий с высоким процентом летальных исходов, большое значение приобретает выявление источников инфекции и установление эпидемических связей. Решение этой задачи возможно методом типирования листерий, подтверждающим идентичность микроорганизмов, выделяемых у больных, носителей и объектов внешней среды. В настоящее время общепринятая международная схема типирования листерий признана несовершенной.

Специфические бактериофаги являются точными индикаторами, определяющими видовую и типовую принадлежность бактерий. Использование наборов таких типоспецифических фагов позволит проводить фаготипирование исследуемых культур с целью эпидемиологического анализа листериозной инфекции: установления источника и путей ее передачи.

В настоящее время для фаготипирования листерий используется набор бактериофагов производ-

ства экспериментального завода «Покровветбиопрепарат» Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии, включающий монофаги *L. 2A* и *L. 4A*. Нами установлено, что *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. grayi* и *L. murrayi* не проявляют чувствительности к указанным фагам. В связи с этим бактериофаги *L. 2A* и *L. 4A* могут быть использованы для более четкой идентификации и биологической характеристики культур листерий, однако для проведения эпидемиологического анализа и сопоставления культур, выделенных из различных объектов окружающей среды и от больных, этого оказалось недостаточно и полученные сведения оказались малоинформативными. Из этого также следует, что используемые на территории РФ наборы листериозных бактериофагов не позволяют применить их для решения задач эпидемиологического плана. Имеется необходимость конструирования нового набора бактериофагов для типирования листерий, в особенности практически не типлируемых сегодня, но весьма активно циркулирующих *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. grayi* и *L. murrayi*.

#### **Т057 ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ СТАФИЛОКОККОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ, К КОММЕРЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ БАКТЕРИОФАГОВ**

**О.В. Ковалишена, Р.Ф. Чанышева**

ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

**Цель исследования:** определение чувствительности клинических штаммов стафилококков, выделенных от пациентов с инфекциями в ходе микробиологического мониторинга в медицинских организациях (МО) региона, к коммерческим препаратам бактериофагов (БФ).

**Материалы и методы.** Фагочувствительность стафилококков определялась к «Бактериофагу стафилококковому» (СБФ), «Интести-бактериофагу» (ИБФ), «Пиобактериофагу комбинированному» (ПБФ). Была проведена оценка чувствительности 289 штаммов *Staphylococcus spp.* (239 штаммов – *S. aureus* и 50 – коагулазонегативные стафилококки (CNS)), выделенных от пациентов 6 МО г. Н.Новгорода и Нижегородской обл. за 2009–2011 гг. Видовая идентификация стафилококков проводилась стандартными методами и с использованием панели *BBLCrystalIDSystems* (США). Оценка литической активности БФ – методом «стерильного пятна», учет результатов – по 4-крестовой схеме. Стафилококки по их чувствительности к применяемым БФ были разделены на: чувствительные – интенсивность лизиса «++++», «+++», «++»; слабочувствительные – «+»; устойчивые – отсутствие лизиса.

**Результаты и обсуждения.** Доля устойчивых штаммов стафилококков колебалась от 41,6±5,8% для СБФ до 48,7±6,5% для ИБФ. Более активным оказался СБФ: доля чувствительных штаммов составила 31,8±5,4% vs 28,2±5,4% у ПБФ и 26,0±5,4% у ИБФ (p>0,05). Устойчивые штаммы преобладали в популяциях *S. aureus* и CNS. Доля устойчивых CNS составила 74,0–82,2%, что в среднем в 2 раза больше, чем у *S. aureus* (34,7–42,1%), p=0,01. Доля чувствительных штаммов CNS в 3,5 раза ниже, чем у *S. aureus* (8,9–10% vs 29,4–36,4%), p = 0,01.

Доля штаммов с перекрестной устойчивостью, (устойчивых к двум и более БФ), значительно высока среди устойчивых к БФ *S. aureus*, CNS: 75,2±8,2% и 94,7±7,3% соответственно. Всего же доля устойчивых (к одному и более БФ) штаммов из числа всех CNS составила 84,4±10,8%, что в 1,7 раза больше, чем у *S. aureus* – 49,6±6,6% (p=0,01).

Полученные результаты подтверждают необходимость подбора адаптированных фаговых препаратов на основе актуальных клинических штаммов; создания специфического коагулазоотрицательного стафилококкового БФ; определения фагочувствительности бактерий в МО в рамках микробиологического мониторинга и комплексной оценки чувствительности к антимикробным препаратам (антибиотикам, дезинфектантам, антисептикам, бактериофагам).

#### **Т058 ИЗУЧЕНИЕ ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ ВЛАГАЛИЩНОГО ОТДЕЛЯЕМОГО ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН**

**С.С. Кожухметов, А.Р. Кушугулова, И.К. Тыныбаева, Д. Байсханова, С.А. Садуахасова, Г.С. Шахабаева, Н.М. Бисенова, Б.Д. Бикебаева, Н.В. Калина, С.К. Бисембаева, В.М. Абрамов**

ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Москва Россия  
ЧУ «Центр наук о жизни», Астана, Казахстан

**Введение.** Бактериальный вагиноз, также называемый неспецифический вагинит или *Gardnerella* связанных вагинит, является состоянием организма, которое по разным оценкам, наблюдается у 10–15% женщин репродуктивного возраста. Это состояние вызвано дисбалансом вагинального микробиома и инфекции половых путей. Этот дисбаланс приводит к увеличению риска внематочной беременности, воспалительным заболеваниям тазовых органов, хроническая тазовая боль, и трубный фактор. Считается, что при наличии данного заболевания наблюдается сдвиг от *Lactobacillus* к более разнообразному полимикробному сообществу.

Исследования на основе традиционного выявления культивируемых организмов при бактериального вагиноза связаны с детекцией изменений в относительном числе различных видов *Lactobacillus* и анаэробные бактерии, включающих *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella spp.*, *Mobiluncus spp.*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Mycoplasma hominis*. Тем не менее, большинство видов бактерий (> 99%) не могут быть выращены в условиях лаборатории. В последние несколько лет, для идентификации всего спектра микроорганизмов, используется последовательность гена 16S рРНК, для обследования вагинального микрофлоры. Эти исследования выявили большое количество бактериальных видов, которые не идентифицировались путем традиционного культивирования. Целью данной работы являлось выявление видового разнообразия микроорганизмов влагалищного отделяемого здоровых женщин.

**Методы.** ДНК из влагалищного отделяемого было выделялось с помощью и набора MegaZorb® DNA Mini-Prep Kit (Promega). Для определения состава микрофлоры был использована амплификации фрагмента гена 16SpРНК. Плазмидная библиотека была получена на основе плазмидных векторов pGem-T (Promega). Определение нуклеотидной последовательности проводили методом Sanger с помо-

шью BigDye Terminator v 3.1 Cycle sequencing Kit в автоматическом генетическом анализаторе ABI 3730xl (Applied Biosystems). Для анализа были использованы программный пакет Informax Vector NTI Suite 9, Sequence Scanner v 1,0.

**Результаты.** Выявлено, что микрофлора образцов влагалищного отделяемого здоровых женщин представлена в основном представителями рода *Lactobacillus* (30%), такие как, *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii*, *L. coleohominis*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. rhamnosus*, *L. vaginalis*. Другими широко представленными родами являются *Streptococcus*, *Dialister*, *Rhodobaca*, *Finexidia*, *Aerococcus*.

#### **T059 ФАГОТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ SALMONELLA ENTERICA, ИЗОЛИРОВАННЫХ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ИЗ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ**

Ю.Н. Козлова<sup>1</sup>, В.Н. Афонюшкин<sup>2</sup>, И.В. Саранина<sup>1</sup>,  
Н.В. Тикунова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup>ГНУ ИЭВСиДВ СО Россельхозакадемии, п. Краснообск, Россия

**Ведение.** *Salmonella enterica* включает в себя более 2500 сероваров, характеризующихся различной гостальной специфичностью, природными резервуарами, токсигенностью, антибиотикорезистентностью, патогенностью, вирулентностью и т.д. В то же время идентификация серовара только иммунохимическими методами не является достаточной, так как патогенность внутри отдельного серовара сальмонелл может варьировать, благодаря наличию плазмид, мутаций и рекомбинации в хромосомной ДНК. Фаготипирование – один из методов, который позволяет оценить различия между штаммами сальмонелл.

**Цель работы.** Изучение возможности фаготипирования штаммы *S. enterica* выделенных из клинических образцов от сельскохозяйственной птицы.

**Материалы и методы.** Объектами исследования были штаммы *S. enterica*, выделенные из клинических образцов от сельскохозяйственной птицы (печени, сердца, кишечника, яичников) и природные бактериофаги. Выявление и идентификацию возбудителя проводили с использованием метода посевов на селективные питательные среды (среда Эндо, селенитовый бульон, висмут-сульфит агар, Уриселект 4). Для определения фагочувствительности штаммов *S. enterica* применяли метод титрования в двойном агаре. Инкубирование проводили при 37 °С, от 18 до 24 часов.

**Результаты.** В ходе проведенного исследования было изучено 34 штамма *Salmonella enterica*. При фаготипировании с использованием 10 сальмонельных бактериофагов из коллекции ИХБФМ СО РАН выяснилось, что 61,8% исследованных бактерий были чувствительны к бактериофагам. Чувствительные к бактериофагам штаммы *S. enterica* были разделены на 12 фаготипов. Такое разнообразие фаготипов свидетельствует о необходимости производства биологической промышленности широкого спектра фаговых препаратов и необходимости создания комбинированных препаратов.

**Заключение.** Использование нашей коллекции бактериофагов позволит более точно выявлять и предупреждать вспышки сальмонеллезом при выращивании сельскохозяйственной птицы и заражение людей при использовании инфицированных продуктов птицеводства.

#### **T060 ФАГОВАЯ КОНВЕРСИЯ CORYNEBACTERIUM DIPHThERIAE И CORYNEBACTERIUM ULCERANS**

С.Ю. Комбарова, В.Г. Мельников, А.М. Бичучер,  
И.К. Мазурова

ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия

Вид *Corynebacterium diphtheriae* включает нетоксигенные и токсигенные микроорганизмы. Последние вызывают у человека токсикоинфекцию – дифтерию. Таксономически близким к виду *C. diphtheriae* и способным вырабатывать дифтериеподобный экзотоксин является *C. Ulcerans* – патоген крупного и мелкого рогатого скота, лошадей и других домашних животных. У человека *C. ulcerans* может вызывать заболевание, сходное с дифтерией. Продукция экзотоксина этими коринебактериями опосредована токсигенными профагами.

Проведены эксперименты по фаговой конверсии и изучению сайтов прикрепления бактериофага на хромосоме *C. diphtheriae* с учетом данных популяционного анализа штаммов, циркулировавших в России в различные периоды эпидемического процесса дифтерийной инфекции. Выявлена зависимость реализации фаговой конверсии от генетических особенностей и времени выделения штаммов-реципиентов и штаммов-доноров токсигенных фагов. Из изученных нетоксигенных *C. diphtheriae*, выделенных после завершения эпидемического подъема 90-х гг. XX в., ген дифтерийного токсина приобрели только штаммы одного риботипа ('Londinium') и только при конверсии фагом из штамма, распространенного в 60-е годы (фаготипа OPQRSTg). Вероятно, в современных условиях низкого уровня циркуляции возбудителя дифтерии фаговая конверсия встречается не часто, так как для ее реализации человек должен быть инфицирован одновременно токсигенным и нетоксигенным штаммами с определенными генетическими особенностями.

Показана возможность процесса вырезания токсигенного коринефага из хромосомы *C.diphtheriae*. Известно, что на хромосоме токсигенных и нетоксигенных *C. diphtheriae* имеются два сайта прикрепления фага – attB1 и attB2. У большинства токсигенных штаммов профагом занят один сайт. В то же время у некоторых нетоксигенных штаммов нами обнаружен только один сайт прикрепления – attB1. Это указывает на то, что в процессе вырезания профага могла произойти его элиминация вместе с attB2-сайтом, в который профаг был интегрирован.

Проведенная конверсия некоторых нетоксигенных *C. ulcerans* фагами, выделенными из токсигенных штаммов *C. diphtheriae*, подтвердила вероятность обмена генетической информацией между двумя родственными видами. Таким образом, выявлены возможности формирования популяций токсигенных и нетоксигенных коринебактерий за счет их внутренних резервов, обеспечивающих сохранение видов в природе.

#### **T061 РАЗРАБОТКА НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЛЕЧЕБНО- ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИОФАГОВ**

С.А. Коровкин, А.В. Катлинский, П.А. Набатников,  
А.В. Семченко, Е.Н. Сятчихина

ООО «ФОРТ», Москва, Россия

В результате проведенных исследований были выделены и охарактеризованы бактериофаги, активные по отношению к *Streptococcus*, *Staphylococcus*,

*Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus*, *Klebsiella pneumoniae* и *E. coli*. У всех фагов изучена литическая активность и спектр литического действия, изучена чувствительность к повреждающим факторам внешней среды: pH, температуре, лиофильному высушиванию. Показано, что ДНК фагов и бактериальных штаммов-хозяев не содержит нуклеотидных последовательностей генов токсинов. В серии технологических экспериментов отработаны условия культивирования для систем «бактериальный штамм-хозяин–бактериофаг», обеспечивающие максимальное накопление бактериальных вирусов, с использованием ГРМ-бульона. Отработана технология раздельного глубинного культивирования бактериальной культуры с бактериофагами в ферментерах с последующей очисткой фаголизатов методом ультрафильтрации. Оптимизированы параметры лиофилизации фаголизатов, изучена сохранение литической активности при температуре 2–8°C в течение 26 мес. Разработан оригинальный состав и технология упаковки комплексного препарата бактериофагов в желудочко-резистентные желатиновые капсулы и во флаконы со спреевой насадкой для формирования мелкодисперсного аэрозоля. Флаконы со спреевой насадкой обеспечивают стерильность раствора комплексного препарата бактериофагов в течение 3 месяцев при ежедневном использовании. Титры монофагов, входящих в состав 6-компонентного препарата, составляли не ниже 10<sup>6</sup>–10<sup>7</sup> по Аппельману. Применение препарата комплексного бактериофага (производства ООО «ФОРТ», Россия) при пероральном и внутрибрюшинном способе введения белым мышам и морским свинкам в диапазоне доз от 10 до 300 Д/кг не вызывает гибели животных, изменения внешнего вида, поведения, снижения двигательной и пищевой активности, изменения физиологических функций, не происходит снижение массы тела и внутренних органов, что свидетельствует об отсутствии токсического действия препарата на системы и органы лабораторных животных. Таким образом, разработанная технология позволяет организовать промышленный крупнотоннажный выпуск комплексного препарата бактериофагов в капсулированной и спрейной лекарственных формах.

#### **Т062 КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВНУТРИУТРОБНЫХ ИНФЕКЦИЙ ХЛАМИДИЙНОЙ И ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ЭТИОЛОГИИ У ДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ**

**Л.И. Королева**

ФГБУ «НИИАГ им.Д.О. Отта» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Проведен анализ перинатальной заболеваемости внутриутробной хламидийной и герпесвирусной инфекциями (ВУИ) у новорожденных детей и особенностей их течения в раннем неонатальном периоде. У детей ВУИ хламидийной этиологии диагностировалась при выявлении *S. trachomatis* методами ИФА, культуры клеток и ПЦР в соскобах со слизистых оболочек задней стенки глотки, конъюнктивы нижнего века, вульвы и в моче; ВУИ герпесвирусной этиологии – при выявлении в крови ДНК HSV и CMV методом ПЦР.

Перинатальная заболеваемость новорожденных хламидийной инфекцией снизилась с 20,5% в 1991 г. до 1,2% в 2010 г. (в 17 раз), герпесвирусной – в 1999–2010 гг. с 3,4% до 0,4% (пики: 2001 г. – 20%, 2003 г. – 20,8%).

В 1995–2010 гг. у доношенных детей от матерей с генитальным хламидиозом, получивших во время беременности макролиды нового поколения (спиромицин, джозамицин, азитромицин), не наблюдалась генерализованная хламидийная инфекция, снизилась в 1,2 раза частота локальной инфекции (конъюнктивит, пневмония) и в 10 раз возросла частота бессимптомной инфекции по сравнению с доношенными детьми (1991–1994 гг.) от матерей с генитальным хламидиозом, получивших во время беременности лечение эритромицином. Персистенция *S. trachomatis* отмечена у доношенных детей на первом году жизни в 70% случаев генерализованной инфекции, в 13,3% – локальной и в 3% – бессимптомной. У доношенных детей с манифестными формами ВУИ хламидийной этиологии был повышен уровень респираторной заболеваемости и высокая частота резидуальных последствий перинатальной патологии ЦНС в возрасте 7–9 лет, а у доношенных детей с бессимптомной хламидийной инфекцией соматическое и психомоторное развитие соответствовало возрасту.

В 1999–2010 гг. клинических проявлений ВУИ герпесвирусной этиологии в раннем неонатальном периоде у доношенных детей (63,1%) не отмечено, у 36,9% имелась асимметричная форма ЗВУР (гипотрофия II–III ст.). Персистенция HSV и CMV на первом году жизни у доношенных детей не выявлена. Катамнестическое наблюдение в первые 3 года жизни показало, что дети редко болели, имели хорошее физическое и психомоторное развитие.

У доношенных детей с бессимптомной хламидийной и герпесвирусной инфекцией повышена способность к продукции IFN-α/β и IFN-γ и отсутствует персистенция возбудителей на первом году жизни. К лечению ВУИ хламидийной и герпесвирусной этиологии следует подходить дифференцированно, с учетом показателей IFN-статуса.

#### **Т063 ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФАГОТЕРАПИИ В КОРРЕКЦИИ МЕСТНОГО ИММУНИТЕТА И ДИСБИОЗА ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ**

**Н.И. Косякова**

Больница Пуцинского научного центра РАН, Пушкино, Россия

**Цель:** изучить эффективность жидкого комплексного пробиотического препарата в коррекции местного иммунитета и дисбиоза верхних дыхательных путей у больных атопической, персистирующей, средне тяжелой БА, имеющих сопутствующие хронические рецидивирующие заболевания ЛОР-органов.

**Материалы и методы:** наблюдались 84 пациента с верифицированным диагнозом БА. (GINA 2012), ср. возраст 54,4±3,6 года, м. – 34, ж. – 50. Все получали адекватную базисную терапию комбинированными и ГКС. Обострения > 4 раз за год после перенесенной ОРВИ и обострения хронических заболеваний ЛОР-органов, которые требовали назначения антибиотиков.

Методом простой рандомизации сформированы 2 группы:

1 гр. (n = 48) – базисная терапия + жидкий комплексный пробиотический препарат + иммуномодулятор (иммуновак)

2 гр. (n = 36) – базисная терапия + антибиотикотерапия + иммуновак.

3 гр. контроля (n = 10) – доноры.

Фаготерапия назначалась местно и *per os* по 10 дней два курса с интервалом в 10 дней. Эффективность оце-

нивалась по клинико-функциональным показателям, данным цитологических, микробиологических и иммунологических исследований. Статистическая обработка с использованием программ Statistica.6.

**Результаты и обсуждение:** через год частота обострений снизилась в 1 гр. в 2,5 раза, во 2 гр. — в 1,3 раза. В циторинограмме число нейтрофилов в 1 гр. уменьшилось в 4,4 раза, во 2 гр. в 2,1 раза. Наряду с грамм (+) микроорганизмами чаще стали высеваться грамм (-) бактерии. Частота микробной обсемененности до лечения в 1 гр. составила 48,3+8,6%, во 2 гр. — 47,9+6,7%. После лечения соответственно — 27,8+9,6% и 42,6+11,4%. После курса фаготерапии в 1 гр. ФАН восстановилась у 56,6% пациентов, но продукция IFN- $\gamma$  оставалась сниженной у 32,7%. Во 2 гр. соответственно у 23,8% и у 55,6%, что отражает функциональную неполноценность клеток иммунного ответа. Полный контроль над симптомами БА после курса фаготерапии удалось установить у 66,6% пациентов, во 2 гр. — у 52,7%.

**Выводы.** Применение жидкого комплексного пробиотикофага в терапии БА с хроническими заболеваниями ЛОР-органов на фоне базисной терапии положительно влияло на микробную обсемененность слизистых верхних дыхательных путей, состояние местного иммунитета, частоту ОРВИ и обострений БА и установление контроля над симптомами БА.

#### **Т064 ВЫБОР БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ ТЕРАПИИ ИНФЕКЦИЙ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* — РАЗНЫЕ ПОДХОДЫ**

**В.Н. Крылов, О.А. Полыгач, О.В. Шабурова, Е.А. Плетенева, С.В. Крылов**

*ФГБУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, РАМН, Москва, Россия*

Повсеместно распространенные грамотрицательные бактерии *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка), могут быть причиной раневых и ожоговых инфекций, госпитальных инфекций при пониженном иммунном статусе пациентов.

Особое значение имеет *P. aeruginosa* как причина пневмонии больных муковисцидозом (МВ), частым наследственным заболеванием европеоидов. Как важнейшая задача в лечении этих больных рассматривается быстрая эрадикация бактерий *P. aeruginosa* при первичной инфекции и предотвращение перехода инфекции в хроническую форму. От этого в значительной степени зависит прогноз, в частности продолжительности жизни больных МВ. Для эрадикации *P. aeruginosa* у первично инфицированных детей с МВ используют антибиотики колистин и тобрамицин, к которым большинство штаммов *P. aeruginosa* пока проявляют чувствительность. Эти антибиотики обнаруживают довольно высокую токсичность в ходе проводимого курса «агрессивной терапии». В то же время, доля колистин-устойчивых штаммов, выделяемых от больных возрастает. Сейчас в Западной Европе и США изучают применимость фаготерапии для эрадикации *P. aeruginosa* у пациентов с МВ. На животных моделях подтверждены возможность доставки концентрированных сухих препаратов фагов в легкие и эффективность эрадикации патогена. Однако возникают опасения, что неконтролируемые взаимодействия разных бактериофагов и разных штаммов бактерий при массовом внедрении фаготерапии могут привести в перспективе к нежелательным, опасным не только для пациентов, эволю-

ционным последствиям. Это правомерные опасения для фаготерапии вообще. Возможность этого подтверждается возникновением высоко патогенных и вирулентных штаммов *P. aeruginosa* с повышенной агрессивностью и способностью к эпидемическому распространению среди здоровых людей с нормальным иммунным статусом. Эти штаммы возникли в центрах по лечению МВ в разных странах и их геномы содержат патогенные профаговые острова.

Будут рассмотрены свойства фагов нескольких видов, активных на *P. aeruginosa* и входящих в состав терапевтических смесей, возможность попадания в лечебные смеси нежелательных бактериофагов, дана оценка возможных нежелательных эффектов при терапии пневмонии у пациентов с МВ. Будут обсуждены несколько возможных схем составления и использования смесей фагов для терапии разных инфекций *P. aeruginosa*.

#### **Т065 УЧАСТОК В ГЕНОМАХ D3-ПОДОБНЫХ ФАГОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* СОДЕРЖИТ ГЕНЫ С НЕИЗВЕСТНЫМИ ФУНКЦИЯМИ — МОЖНО ЛИ ИСПОЛЬЗОВАТЬ МУТАНТЫ УМЕРЕННЫХ ФАГОВ В ТЕРАПИИ?**

**С.В. Крылов<sup>1</sup>, А. Крoпински<sup>2</sup>, Е.Н. Чеснокова<sup>1</sup>, О.В. Шабурова<sup>1</sup>, М.В. Буркальцева<sup>1</sup>, А.М. Каплан<sup>1</sup>, О.В. Полыгач<sup>1</sup>, В.Н. Крылов<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУ НИИВС им. И.И. Мечникова, РАМН, Москва, Россия

<sup>2</sup> PHAC, Laboratory of Foodborn zoonoses, Guelph, ON, Канада

Длительное применение антибиотиков привело к появлению штаммов *Pseudomonas aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью. Использование фаготерапии неизбежно будет приводить к отбору фагоустойчивых мутантов. Возможно, что в таких случаях придется использовать для терапии литические варианты умеренных фагов. Действительно, некоторые из них могут эффективно убивать бактерии, устойчивые к литическим фагам. Однако надо учитывать, что бактериофаги являются активными участниками эволюции бактерий. Так, активность умеренных бактериофагов уже привела к возникновению особо опасных штаммов *P. aeruginosa* с повышенной вирулентностью и патогенностью, способных инфицировать здоровых людей и вызывать эпидемические вспышки в центрах лечения муковисцидоза. В геноме одного из таких штаммов, *P. aeruginosa* LESB58, есть несколько геномных островов с различными профагами, родственными ранее изученным умеренным фагам. Считается, что именно активность генопродуктов новых генов, привнесенных умеренными профагами, приводит к появлению высокой патогенности, вирулентности и способности к эпидемическому распространению.

Один из профаговых геномных островов штамма LESB58 содержит профаг, родственный умеренному фагу D3. Мы сравнили последовательность ДНК этого участка с геномами исходного фага D3, а также двух имеющихся в нашей лаборатории D3-подобных фагов, phi297 и phiPMG1. Геномы всех этих фагов секвенированы и данные находятся в GenBank: (NC\_002484 (фаг D3), NC\_016765 (фаг phiPMG1) и NC\_016762 (фаг phi297)). Геном phiPMG1 имеет очень высокую степень гомологии с геномом D3, за исключением зоны прерывистой негомологии между нуклеотидами 28592 и 42944. Сравнение нуклеотидных последовательностей в этой области у D3 и phiPMG1 подтверждает, что различие возникло в результате актов независимых

обменов с геномами многих штаммов и видов бактерий и фагов. Последовательности нуклеотидов в этой области фага phiPMG1, не имеющие гомологии с геномом исходного фага D3, обнаруживают гомологию с D3-подобным профагом в патогенном отсраве эпидемического штамма *P. aeruginosa* LESB58.

Таким образом, использование в фаготерапии литических вариантов умеренных бактериофагов возможно, но лишь в и в условиях, исключающих распространение бактериофага (это последнее требование можно рассматривать в качестве обязательного при использовании фаготерапии).

#### **T066 БАКТЕРИОФАГ *ESCHERICHIA COLI* 9g – ВОЗМОЖНЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ НОВОГО РОДА СИФОВИРУСОВ, ОБЛАДАЮЩИЙ НЕОБЫЧНЫМИ БИОЛОГИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ**

Е.Е. Куликов<sup>1,2</sup>, А.К. Голомидова<sup>1</sup>, М.А. Летарова<sup>1</sup>,  
Е.С. Кострюкова<sup>3,4</sup>, А.С. Зеленин<sup>3</sup>, Н.С. Прохоров<sup>1</sup>,  
А.В. Летаров<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН», Москва, Россия

<sup>2</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Московская обл., Россия

<sup>3</sup>НИЦ Физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия

<sup>4</sup>Казанский федеральный университет, Казань, Россия

Бактериофаг 9g был выделен в 2010 г. из фекалий лошади с использованием лабораторного штамма *Escherichia coli* С600 в качестве хозяина. Морфологически этот фаг выглядит как «банальный» сифовирус со слегка вытянутым капсидом ок. 35×55 нм и несократимым хвостом длиной около 120 нм. Однако, более детальное изучение этого фага обнаружило, что он обладает целым рядом необычных биологических свойств. Полный геном фага 9g составляет 56703 н.п. и кодирует 70 открытых рамок считывания. Ближайший родственный фагу 9g геном принадлежит фагу PhiJL001, инфицирующему морские альфа-протеобактерии, ассоциированные с губкой *Ircinia strobilina*. Однако низкий уровень сходства (51% идентичности аминокислотных остатков в главном белке капсида) позволяет считать фаг 9g потенциальным представителем нового рода.

Геном фага 9g разделен на два разнонаправленных региона, ранне-средний и поздний, которые транскрибируются с двух противоположных промоторов, расположенных рядом друг с другом. Такая организация генома часто свойственна умеренным фагам, однако фаг 9g не содержит гена интегразы и не образует истинных лизогенов. При этом он легко формирует перевиваемые псевдолизогенные ассоциации с хозяином, которые могут быть излечены от фага обработкой вирицидным агентом. Одним из наиболее необычных свойств фага 9g является наличие полного набора генов для синтеза кьюозина – неканонического основания, встречающегося в некоторых тРНК. В случае фага 9g эти ферменты, по-видимому, вовлечены в синтез модифицированного основания, включаемого в состав ДНК. Об этом свидетельствует устойчивость ДНК фага к гидролизу большинством рестриктаз, сайты которых присутствуют в последовательности генома. Однако точная химическая природа модифицированного основания у фага 9g пока не установлена.

Работа поддержана грантами РФФИ No.13-04-01575, Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», а также в рамках Программы развития Казанского федерального университета.

#### **T067 ГЛИКОМ ФЕРМЕНТОВ И БАКТЕРИОФАГИ: СТРАТЕГИИ СИНЕРГИЗМА**

М.В. Лахтин<sup>1</sup>, В.М. Лахтин<sup>1</sup>, А.В. Алешкин<sup>1</sup>,  
С.С. Афанасьев<sup>1</sup>, В.А. Алешкин<sup>1</sup>, М.С. Афанасьев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,  
Москва, Россия

<sup>2</sup>Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Бактериолиз – многофакторный каскад, осложненный в биотопах организма. К факторам относятся: наличие аффинных меток узнавания на бактериях (Б), степень (ауто/гетеро)агрегированности клеток, популяционное разнообразие (жизненный цикл клеток, степень синхронизации культуры, доминирование популяции), вирусная и экзо/эндоферментативная природа модификации слоевой топографии клеточной поверхности, истонченность клеточной стенки Б, доступность пор для закачивания ионов и последующего осмотического шока. Во всех этих процессах участвуют ферменты (Ф): гликозилированные, в ассоциатах с гликоконъюгатами (ГК), алгоритмизированные по месту и времени в сетях, маскированные и в виде гликопредшественников. При этом у Ф в распознавании Б-мишеней кофункционируют каталитический центр (например, ГК-распознающий участок Ф углеводного обмена), участок лектинового типа, углеводная часть (УЧ). Нами систематизированы особенности гликома Ф (наличие N- и O-гликанов, гликопептидов, их микрогетерогенность; множественность молекулярных форм Ф [с различными активностями под влиянием УЧ], по-разному реагирующих с панелью лектинов; даны расчеты УЧ, гликанов и распределения форм Ф, обоснованы прогнозы структур гликанов). Представлены данные гликома примерно 500 номенклатурных Ф и их комплексов с лектинами и другими белковыми модуляторами по результатам взаимодействия со 115 типами ГК-распознающих реагентов.

Данные о гликоме Ф позволяют обосновывать, прогнозировать, комбинировать антимикробный синергизм (1) или антагонизм (2) бактериофагов (БФ) и Ф окружающей среды. 1. В условиях остропротекающей болезни (сильное воспаление и др.) резко усиливается гидролитический потенциал биотопа (гидролазы истончают стенку и вызывают неспецифический лизис популяций Б дополнительно к действию БФ). Ф углеводного обмена, высвобождающие и модифицирующие пребиотические, антимикробные и антиоксидантные ГК, повысят эффективность БФ. Лектины пробиотических бактерий, С4В системы комплемента, биосурфактанты и (глико)пептиды проявляют дополнительный антипатогенный вклад. 2. Оксидоредуктазы мешают БФ как сшивающие мишени и части БФ агенты, препятствующие цитолизу. Присутствие антиоксидантных ГК (их коктейлей) защитит систему БФ—Б.

#### **T068 ЛЕКТИНЫ И ГЛИКОКОНЪЮГАТЫ: ПОДХОДЫ И УСТАНОВЛЕННЫЕ НАМИ РЕЗУЛЬТАТЫ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМЫ ВЫСОКОСТАБИЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИОФАГОВ С ВЫСОКИМИ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКИМИ АКТИВНОСТЯМИ**

М.В. Лахтин<sup>1</sup>, В.М. Лахтин<sup>1</sup>, А.В. Алешкин<sup>1</sup>,  
С.С. Афанасьев<sup>1</sup>, В.А. Алешкин<sup>1</sup>, М.С. Афанасьев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,  
Москва, Россия

<sup>2</sup>Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

В концентрированном виде лектины (Л) и белокосодержащие гликоконъюгаты (ГК) находятся

в латентном, законсервированном стабильном состоянии с маскированными участками биоузнавания по данным собственной флюоресценции (триптофановой, тирозиновой, небелковой, длинноволновой у комплексов), которые проявляются при рефолдинговых высоких разведениях (существенно превосходящих титровые концентрации цитоагглютинации). При этом достигнутые активированные состояния Л и ГК, Л-ГК могут быть дополнительно стабилизированы неионными (околонейтральными) (био)сурфактантами бактериальной природы или твинами.

Двумерное титрование агрегированных (мультивалентных) Л в микропанели с последующим проявлением клетками, а также титрование Л1/Л2-сенсibilизированных клеток в микропанели с Л2/Л1-сенсibilизированными лунками (с дополнительным проявлением клетками разных типов) позволяют контролировать как двумерную картину детергент-подобного диспергирования клеток (рассасывающих агглютинаты активностей 1-го, 2-го, 3-го, другого порядков – по сути, первых этапов действия эндолизина), так и аффинные особенности межклеточных взаимодействий Л—ГК и ГК—Л в присутствии сублитических концентраций ферментов. В вариантах хранения ресуспендируемых Л-клеточных форм наблюдаются: обратимая сборка частиц (первые часы, без ГК; первые дни, после добавления специфических ГК); необратимая сборка, усиливающаяся со временем на фоне видимого цитолиза в других лунках (где нет выраженной биопленки, но присутствует клеточная пуговица в центре), также усиливающегося во времени; действие оксидоредуктаз после цитолиза.

Готовые твердофазные (в том числе имитирующие пористую гидрофобную клеточную поверхность) сборочные векторные (направленные в пространстве) алгоритмизированные частично обратимые надмолекулярные Л-гликопротеиново-антителенные конструкции могут быть защищены и стабилизированы в различной степени заданной внешней псевдополисахаридной архитектурой антиоксидантной направленности.

Для поддержания диспергированности Л-частиц целесообразно выбирать эффективные ГК с дополнительными пребиотическими свойствами.

#### **Т069 ЛАКТОБАЦИЛЛЫ БИОТОПА СИНХРОНИЗИРУЮТ КУЛЬТУРЫ КАНДИД ТОГО ЖЕ БИОТОПА**

**В.М. Лахтин<sup>1</sup>, М.В. Лахтин<sup>1</sup>, А.Л. Байракова<sup>1</sup>, С.С. Афанасьев<sup>1</sup>, А.В. Караулов<sup>2</sup>, М.С. Афанасьев<sup>2</sup>, В.А. Алешкин<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия

<sup>2</sup>Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

**Введение.** Рост кандид в стандартных средах сопровождается не стабильным биопленкообразованием (БПО). Межвидовые взаимосвязи играют важную роль в биотопе. Цель – исследовать влияние лактобацилл на БПО кандидами.

**Материалы и методы.** Исследовали изолированные из урогенитального биотопа *L. acidophilus* 106, 124, 183а; *L. brevis* 104, 109, 143; *L. casei* 124b, 183; 22 штамма кандид, в том числе не стабильно растущие *C. albicans* 45, 161; *C. krusei* 125 и *C. tropicalis* 112, 417 и 433. Использовали разработанную методологию сравнительного ранжирования роста и БПО культу-

рами микробов. Штаммы 124 и 124б служили в качестве лидерных. Упорядоченность рядов оценивали по видовой сблоченности штаммов. Суспензии микробов смешивали в оптимизированных соотношениях с MRS в микропанели и инкубировали 2 суток при 37°C. БП обрабатывали генцианвиолетом, краситель экстрагировали и измеряли в области 600 нм.

**Результаты.** В присутствии лактобацилл наблюдались стабилизация роста и БПО не стабильно растущих монокультур штаммов кандид. Пулы лактобацилл видазависимо синхронизировали БПО кандидами, позволяли выявлять по две экосистемы *C. albicans* и *C. tropicalis*. Штаммы 124 и 124б противоположным образом упорядочивали субвидовые популяции штаммов *C. albicans* и *C. tropicalis*.

**Закключение.** Лактобациллы перспективны для стабилизации роста дрожжей и дрожжеподобных микромицетов. Пулы лактобацилл проявляют свойства синхронизаторов видов кандид, упорядочивают микрэкосистемы биотопа, усиливают его мультиузловую сетевую стабильность. Перспективно высевать кандиды из смешанных БП. Результаты указывают на то, что выделяемые изоляты кандид находятся в ассоциатах со стабилизаторами микробной природы, которые могут утрачиваться при последующих пассажах. Результаты свидетельствуют в пользу того, что кандиды проявляют общую эволюционно поддерживаемую реакцию скоординированного сплывания своих рядов в ответ на недружественные действия со стороны бактерий окружения.

#### **Т070 БАКТЕРИОФАГИ В МИКРОБИОМАХ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА**

**А.В. Летаров**

ФГБУН «Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского» РАН, Москва, Россия

Роль бактериофагов в микрофлоре людей и животных обычно считают «весьма важной», однако точных данных по этой проблеме пока мало. Накопленные на сегодня данные дают мало информации о действующих «правилах игры» во взаимоотношениях популяций фагов и бактерий в природных экосистемах с крайне высокой плотностью жизни, таких как, например толстый кишечник. Данные полученные культуральными методами, свидетельствуют, что большая часть колифагов, выделяемых от здоровых людей принадлежит к разным группам умеренных фагов (см. обзоры Letarov and Kulikov 2009, Letarov 2012). В то же время содержание вирулентных колифагов было резко увеличено у пациентов с различными заболеваниями. Анализ вирусного метабенома также позволяет предположить преобладание в кишечнике человека умеренных фагов (Waller et al. 2014, Reyes et al. 2010).

В недавней работе Minot et al. (2013) было показано, что на больших промежутках времени состав виroma кишечника человека остается весьма стабильным – более 60% обнаруженных при метабеномном секвенировании генотипов фагов персистеровали в течение 2,5 лет наблюдения. Более того, состав кишечного виroma у людей оказался высоко индивидуальным, существенно различаясь даже у однойцевых близнецов (Reyes et al. 2010). Вариации виroma в ответ на резкие изменения диеты были менее выраженными, чем межиндивидуальные раз-

личия. Все это свидетельствует в пользу того, что история колонизации кишечника в начале жизни оказывает определяющее воздействие на структуру индивидуального вирусного сообщества кишечника у человека. В целом, набор имеющихся данных хорошо согласуется с гипотезой, что размножение бактериофагов в литическом цикле в значительной степени подавлено факторами среды, существующими в кишечнике человека (а также некоторых иных видов млекопитающих). Вполне вероятно, что индукция лизогенных бактерий является основным источником вирусоподобных частиц, обнаруживаемых в фекалиях людей. Высокое содержание умеренных фагов по-видимому способствует функционированию фагового сообщества кишечника человека в качестве резервуара бактериальных адаптационных генов, в том числе — генов устойчивости к антибиотикам (Modi et al., 2013). Динамика и разнообразие кишечных бактериофагов у других видов млекопитающих изучены в значительно меньшей степени, однако косвенные данные свидетельствуют, что возможно существование как минимум двух типов экологии кишечных бактериофагов: с преобладанием лизогенного цикла (как у человека, крыс, мышей, собак) и с преобладанием литического цикла (как у лошадей, а также, возможно, свиней и кур). Необходимы дополнительные сравнительные исследования для окончательного прояснения данного вопроса и для установления механизмов, определяющих подобные различия.

#### **T071 СТАБИЛЬНО ПЕРЕВИВАЕМЫЕ ПСЕВДОЛИЗОГЕННЫЕ АССОЦИАЦИИ ВИРУЛЕНТНЫХ КОЛИФАГОВ G7C И 9G И ИХ БАКТЕРИЙ-ХОЗЯЕВ**

М.А. Летарова, А.К. Голомидова, Е.Е. Куликов, А.В. Летаров

ФГБУН «Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского» РАН, Москва, Россия

Выделенные из кишечника лошади бактериофаги обнаруживают способность создавать стабильно перевиваемые ассоциации (они же псевдолизогенные ассоциации или ПА) со штаммами-хозяевами. Многие вирулентные фаги, выделенные из кишечника лошади, обладают узким хозяйским спектром, вплоть до того, что могут инфицировать только один штамм хозяина, как, например, N-4 подобный фаг G7C. Существуют и фаги обладающие более широким спектром, как, например, T5-подобный фаг 9g. И тот и другой фаг создают стабильно перевиваемые в лабораторных условиях ассоциации со своими хозяевами.

Нами получены ПА этих фагов с их хозяевами, стабильно существующие в течение 20 поколений.

Такие перевиваемые ассоциации состоят из следующих элементов: клетки штамма-хозяина, чувствительные к фагу, клетки, устойчивые к фагу, собственно фаг и его дериваты.

В паре G7C-4S в процессе перевивания ассоциаций образовались дериваты исходного фага и исходной культуры клеток. Уже в третьем поколении обнаружен фаг ø8810, являющийся производным от G7C и имеющий практически идентичный с ним геном. Тем не менее, фаг ø8810 не адсорбируется на клетки культуры 4s.

Среди клеток, устойчивых к исходному бактериофагу G7C выделяются три разновидности культуры,

различающихся по чувствительности к фагу G7C, его деривату 8810 и к фагам из коллекции лаборатории. Одна из этих культур — 4s As чувствительна к фагу 8810, остальные две культуры к обоим фагам устойчивы, но в разной степени — 4sR устойчив к G7C, но с частотой  $10^{-5}$  на нем растет 8810, а на газонах культуры 4sAg не растет ни сам G7C ни его дериват.

К двенадцатому поколению ПА, запущенных из пары G7C-4s полностью превращаются в систему 8810-4sAs и в таком виде существуют по крайней мере еще пять поколений.

Стабильные ассоциации фага 9g, перевивающиеся по крайней мере в течение пятнадцати поколений были получены с четырьмя хозяевами — с упомянутыми выше эндогенными штаммами 4s As, 4s R и 4s Ag, и с лабораторным штаммом С600, на котором его выделили. Состав ассоциаций был исследован для пар 9g-4s As и 9g-С600. В процессе перевивания не наблюдалось падения содержания бактериофага, достигнутого к третьему поколению (7–10 фагов на клетку). К двенадцатому поколению в составе ПА с обоими хозяевами наблюдались от семи до двенадцати культур, обладающих различной степенью чувствительности к исходному бактериофагу, а эффективность посева фага 9g, выросшего в ПА, на разных штаммах стал отличаться от исходного в зависимости от того, с каким хозяином были образованы ассоциации.

Таким образом, нами были получены стабильные перевиваемые ассоциации двух различных бактериофагов и исследован их состав.

#### **T072 СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ *KLEBSIELLA PNEUMONIA***

Е.А. Ляшенко, Г.Р. Садртдинова, Д.А. Васильев

ФГБОУ ВПО УГСХА им. П.А. Столыпина, Ульяновск, Россия

Исследование заключалось в изучении основных биологических свойств, бактериофагов бактерий *Klebsiella pneumoniae*. Сравнительный анализ биологических свойств, проводили в отношении двух бактериофагов (K-1 УГСХА — музейный штамм и K-81/1 УГСХА выделенный нами).

Литическая активность бактериофагов оценивалась по их способности вызывать лизис бактериальных культур в жидких или плотных питательных средах.

Для изучения спектра литической активности использовали метод нанесения капель бактериофагов на газон исследуемой культуры. В качестве исследуемых культур использовали 13 музейных штаммов бактерий рода *Klebsiella* кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновской ГСХА им.П.А.Столыпина.

Изучение специфичности бактериофагов проводили по отношению к представителям других родов семейства *Enterobacteriaceae*: *Escherichia spp.*, *Proteus spp.*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Providencia spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, а также родов семейств *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*

В результате проведенных исследований нами установлено, что фаги образовывали стекловидные колонии размером 1–2 мл в диаметре. Литическая активность по методу Аппельмана составила от  $10^{-5}$  (K-81/1) и  $10^{-8}$  (K-1), а также от  $4 \times 10^7$  до  $3 \times 10^8$  фаговых корпускул в 1 мл (по Грация). По отношению к изучаемым



мым культурам бактерий рода *Klebsiella* фаги обладали разным диапазоном литической активности. К-1 УГСХА – 15,3%, а К-81/1 УГСХА – 7,6%. Установлено, что селекционированный фаг неактивен по отношению к представителям бактерий других родов и семейств.

При выделении бактериофагов (очищении супернатанта) было установлено, что фаг К-81/1 УГСХА не термоустойчив. Поэтому последующее очищение фаголизата проводили хлороформом.

### **T073 СЕЛЕКЦИЯ ВЫДЕЛЕННЫХ КЛОНОВ БАКТЕРИОФАГОВ, АКТИВНЫХ К *KLEBSIELLA PNEUMONIA***

Е.А. Ляшенко, Г.Р. Садрtdинова, С.Н. Золотухин,  
Д.А. Васильев

ФГБОУ ВПО УГСХА им. П.А. Столыпина, Ульяновск, Россия

Селекцию и повышение литической активности выделенных клонов бактериофагов осуществляли с помощью пассирования фага на индикаторной культуре с периодической отливкой типичных негативных колоний по методике предложенной И.М. Габриловичем (1992), С.Н. Золотухиным (1994).

Готовили разведение выделенного фага в мясопептонном бульоне рН (7,2 – 7,4) от  $10^{-1}$ - $10^{-9}$ . Фаг высевали методом агаровых слоев (по Грация), используя разведения  $10^{-6}$  -  $10^{-9}$ , так чтобы на питательном агаре сформировались отдельные негативные колонии. После 24-часового инкубирования в термостате, отливали бактериологической петлей одну негативную колонию, расположенную изолированно от других не менее чем 10 мм и помещали в пробирку с мясопептонным бульоном, туда же вносили 18 часовую бульонную индикаторную культуру *Klebsiella pneumonia* в количестве 0,2 мл. Одновременно ставили контроль мясопептонный бульон с индикаторной культурой без фага. Опытные и контрольные пробирки культивировали в термостате при 37°C в течение 4 ч, а затем оставляли пробирки при комнатной температуре на 20 ч. Полученный фаголизат обрабатывали хлороформом в течение 30 минут и исследовали методом агаровых слоев. Отбирали идентичную исходной негативную колонию и пассировали. Проводили до четырех пассирований, после чего селекцию считали законченной.

В результате проведенных исследований из объектов санитарного надзора нами выделен и селекционирован один штамм бактериофага *Klebsiella pneumonia* (К-1/1 УГСХА). При обработке фаголизата от жизнеспособных бактериальных клеток индикаторной культуры (*Klebsiella pneumonia* 81<sub>11</sub>) нами было установлено, что фаг не проявил термоустойчивость.

### **T074 АНАЛИЗ ЛЕТАЛЬНОСТИ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ С И БЕЗ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ ПО ДАННЫМ ПРОТОКОЛОВ ВСКРЫТИЙ В 2013 ГОДУ**

М.Ю. Майская

Городское патологоанатомическое бюро, Санкт-Петербург,  
Россия

В 2013 г на основе разработанной в ГПАБ специальной программы было проанализировано 413 протоколов вскрытий, в которых туберкулез фигурировал в качестве основного, конкурирующего или сопутствующего заболевания. Из них количество ВИЧ-инфицированных (большинство – в стадии 4в-5) было 279 (67,5%), без ВИЧ-инфекции – 134 (32,5%).

Мужчин было 314 (76%), женщин – 99 (24%). Среди ВИЧ–позитивных пик летальности пришелся на возраст 40–49 лет – 175 (62,7%) умерших, среди ВИЧ–негативных – на возраст – 50–59 – 29 (21,6%). В группе ВИЧ-позитивных туберкулез в качестве ведущего вторичного заболевания был диагностирован в 273 (97,8%) случаях, причем генерализованные формы – в 244 (87,5%), а в группе ВИЧ-негативных в качестве основного заболевания – в 123 (92,8%) случаях. У ВИЧ-негативных умерших генерализованные формы отмечены в 33 (24,6%) случаях, тяжелые деструктивные формы с преимущественным поражением легких – в 74 (55,2%); преобладали фиброзно-кавернозный (47) и гематогенно-диссеминированный туберкулез (22). Преобладание деструктивных и генерализованных форм туберкулеза отчасти связано с распространением лекарственно устойчивых форм микобактерий, выделенных в группе ВИЧ-позитивных случаев в 55 (19,7%) наблюдениях, а в ВИЧ-негативной группе – в 33 (25,4%). При генерализованном туберкулезе чаще всего пораженными органами (помимо легких) в обеих группах были селезенка (203 случая), почки (171), печень (122), оболочки головного мозга (110), кишечник (82). Частота поражения лимфатических узлов была следующей – внутригрудные (250), брюшной полости (174), забрюшинные (111), периферические (76). Отмечалось сочетание туберкулеза с другой социально значимой инфекцией – вирусным гепатитом. В ВИЧ-позитивной группе вирусный гепатит «С» или «В+С» диагностирован в 246 (88%) случаях, в группе ВИЧ-негативных умерших – в 17 (12,7%) случаях. Наркозависимыми являлись 173 (62%) ВИЧ-позитивных пациента и только 5 (3,7%) ВИЧ-негативных. Хроническая алкогольная болезнь диагностирована у 16% ВИЧ-позитивных и у 15% ВИЧ-негативных умерших. Таким образом, анализ летальности в г. Санкт-Петербурге в 2013 г. показывает, что речь идет о широком распространении сочетанной инфекции – ВИЧ и туберкулез с преобладанием генерализованных полиорганов поражений.

### **T075 БАКТЕРИОФАГИ ПАТОГЕННЫХ ИЕРСИНИЙ: ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ**

Л.Д. Македонова, Т.А. Кудрякова, Г.В. Качкина,  
Н.Е. Гаевская

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт  
Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия

Иерсиниозы широко распространены в мире. В некоторых странах Европы кишечный иерсиниоз занимает третье место по заболеваемости среди кишечных инфекций. В России заболеваемость псевдотуберкулезом регистрируется повсеместно. Выраженный полиморфизм клинических проявлений и частое развитие осложнений в ходе инфекционного процесса иерсиниозов требуют дальнейшего усовершенствования лабораторной диагностики этих заболеваний. При идентификации и дифференциации возбудителей иерсиниозов значительное место принадлежит определению их фагочувствительности.

Целью работы была характеристика бактериофагов *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, выделенных из музейных штаммов. Индикаторами для 8 чумных, 12 псевдотуберкулезных и 9 кишечной иерсиниозных бактериофагов служили гомологичные штаммы.

Исследуемые чумные бактериофаги принадлежали к III и IV морфологическим группам по классификации А.С.Тихоненко (1968). Бактериофаги относились к I-II серологическим группам. Они ли-

зирования 100% *Y. pestis*, 50-65% *Y. pseudotuberculosis* и 10-15% *Y. enterocolitica*.

Выделенные псевдотуберкулезные бактериофаги принадлежали к III морфологической группе и обладали широким спектром активности, лизируя 50-100% штаммов *Y. pseudotuberculosis*, 100% штаммов *Y. pestis*, 2,6-20,5% штаммов *Y. enterocolitica*. Бактериофаги полностью нейтрализовались гомологичной антифаговой сывороткой I серотипа.

Морфологическая структура бактериофагов *Y. enterocolitica* представлена III, IV, V группами по классификации А.С.Тихоненко. Выявлено 3 серологических типа кишечной иерсиниозных бактериофагов. Результаты, полученные при изучении спектра литической активности бактериофагов *Y. enterocolitica*, установили специфичность 6 из них. Диапазон их литической активности в отношении гомологичных штаммов колебался от 3,7 до 31,7%. Перекрестная реакция нейтрализации чумных, псевдотуберкулезных и кишечной иерсиниозных бактериофагов с полученными к ним антифаговыми сыворотками антигенного родства между ними не выявила.

Таким образом, бактериофаги чумных, псевдотуберкулезных и кишечной иерсиниозных бактерий обладали специфическими серологическими свойствами. Они характеризовались индивидуальными особенностями в диапазоне литической активности, которые могут быть использованы в лабораторной диагностике для идентификации и дифференциации патогенных видов иерсиний.

#### **T076 РАЗРАБОТКА НОВОГО НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ЛИНЕЙНОГО ИММУНОБЛОТТИНГА С ЦЕЛЬЮ ДИАГНОСТИКИ TORCH-ИНФЕКЦИЙ**

**С.Г. Марданлы, В.А. Арсеньева, Ю.А. Акиншина,  
Е.А. Амелина, М.В. Захаров, А.В. Никитина**  
ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск, Россия

Для реализации возможности тотального лабораторного мониторинга групп риска по TORCH-инфекциям разработана первая отечественная тест-система «Лайн-Блот TORCH-профиль-IgG», которая позволяет при проведении одного анализа одновременно выявить наличие антител к возбудителям токсоплазмоза, цитомегаловируса, краснухи и герпесной инфекции 1 и 2 типа методом линейного блоттинга.

Иммуносорбент представляет собой стрип из нитроцеллюлозной мембраны с нанесенными на него линиями антигенов, наличие и интенсивность окраски которых предполагается оценивать. При разработке тест-системы кроме очищенных нативных антигенов зарубежных производителей были использованы высокоспецифичные рекомбинантные аналоги антигенов ЦМВ, ВПГ-1, ВПГ-2 производства ЗАО «ЭКОлаб». Окрашивание дополнительной полосы рекомбинантного антигена р30 позволяет исключить первичную инфекцию токсоплазмоза в течение последних 3 месяцев. Сравнение интенсивности окрашивания основной антигенной полосы вируса краснухи и полосы контроля вакцинации Ru-Cut off позволяет судить о наличии или отсутствии защитного иммунитета к этому вирусу.

Наличие *контрольных линий* позволяет полуколичественно оценивать интенсивность окрашивания антигенных полос и правильность выполнения анализа.

При исследовании сывороток стандартных панелей (ЗАО «МБС», ЗАО «Вектор-Бест»), сывороток беременных женщин и лиц, проходивших плановое или специализированное обследование, была показана 100% диагностическая чувствительность и специфичность тест-системы «Лайн-Блот TORCH-профиль-IgG». Сомнительные образцы были исследованы также в тест-системе «Recomline TORCH Screening IgG» фирмы Микроген (Германия). Получено полное совпадение результатов.

Иммуноблоттинг можно эффективно применять не только для подтверждения, но и для скрининга посредством размещения на стрипе наиболее иммунокомпетентных антигенов возбудителей TORCH-инфекций. Новая тест-система «Лайн-Блот TORCH-профиль-IgG», может быть адекватной заменой пяти скрининговых ИФТС как по диагностической эффективности, так и по конечной стоимости и продолжительности единичного исследования.

#### **T077 ПОЛУЧЕНИЕ БИОПЛЕНКИ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ЛАКТОБАЦИЛЛ МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

**В.Г. Мельников<sup>1</sup>, Н.А. Ушакова<sup>2</sup>, В.С. Хлебников<sup>1</sup>,  
И.В. Косарев<sup>1</sup>, В.К. Сакулин<sup>1</sup>, Р.Н. Василенко<sup>1</sup>,  
А.А. Мещерякова<sup>1</sup>, Н.Л. Куликова<sup>1</sup>, Б.Б. Кузнецов<sup>3</sup>,  
Д.С. Груздев<sup>3</sup>, В.М. Абрамов<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ОАО «Институт инженерной иммунологии», п. Любучаны,  
Московская обл., Россия

<sup>2</sup>ИПЭЭ РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup>Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, Россия

Известно, что в природе бактерии растут и размножаются, образуя биопленки. Как полагают некоторые исследователи, биопленка представляет собой многоклеточный организм с присущим ему циклом развития, кооперативным поведением составляющих его особей, которые координируются системой *quorum sensing*.

Представители рода *Lactobacillus* относятся к числу доминирующих форм в биопленке симбионтов кишечника человека и животных. «Природный» способ существования бактерий активно исследуется. В основном изучают биопленки болезнетворных бактерий для того, чтобы научиться эффективно бороться с хронической инфекционной патологией. Мы предприняли попытку получить *in vitro* биопленку пробиотического штамма *Lactobacillus plantarum* 8-RA-3 и оценить возможность ее использования для восстановления нарушенной антибиотиками нормальной лактофлоры кишечника у мышей.

В качестве посевного материала применяли лиофильно высушенную культуру *L. plantarum* 8-RA-3 с титром  $1,2 \times 10^{10}$  КОЕ/мл. При проведении твердофазного культивирования лактобацилл использовали пшеничные отруби производства ООО «Здравница», Россия. Электронную микроскопию осуществляли при помощи сканирующего электронного микроскопа CamScan MB2300. Начальные стадии формирования биопленки отмечались к 48 ч культивирования, появлялись бактерии, окруженные межклеточным матриксом. Окончательное формирование биопленки происходило к 72 ч наблюдения.

Более 90% живых бактериальных клеток переходили в некультивируемые формы, из них 75% приобретали кокковидную форму. У мышей с экс-

периментальным дисбиозом, которым скормили 72 ч ферментированные отруби. Отмечалось более эффективное восстановление численности лактобацилл по сравнению с группой животных, в рацион которых были включены неферментированные отруби. К 27 дню исследований уровень лактобацилл у мышей опытной группы соответствовал норме, в то время как в контрольной группе, получавшей неферментированные отруби, он был ниже исходного уровня на 2 порядка. Обнаружение штамма *L. plantarum* 8-RA-3 в составе микрофлоры фекалий через 5 суток после последнего скормливания биопленки *L. plantarum* 8-RA-3 свидетельствовало о восстановлении культивируемости данного штамма и колонизации им кишечника животных. Изоляты *L. plantarum*, идентичные штамму *L. plantarum* 8-RA-3 отсутствовали в контрольных группах.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что лактобациллы способны к образованию биопленки на поверхности отрубей и переходу в некультивируемые покоящиеся кокковидные формы. Они способны преодолевать желудочно-кишечный барьер, восстанавливать культивируемость. Способствуя нормализации резидентной микрофлоры, нарушенной под влиянием антибиотиков. Механизмы этого феномена не ясны, и их предстоит в дальнейшем изучать. Тем не менее, результаты наших исследований свидетельствуют о целесообразности применения биопленки для создания медицинских пробиотических препаратов и продуктов функционального питания нового поколения.

#### **T078 НОВАЯ ПЕПТИДОГЛИКАНГИДРОЛАЗА БАКТЕРИОФАГА RB49**

**Г.В. Микулинская<sup>1,2</sup>, С.В. Чернышов<sup>1</sup>, М.С. Шаврина<sup>1,2</sup>, А.А. Зимин<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Филиал Института биоорганической химии РАН, Пушкино, Россия

<sup>2</sup>Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино, Россия

<sup>3</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пушкино, Россия

Пептидогликангидролазы бактериофагов привлекают большое внимание ввиду возможности применения «извне» в качестве бактерицидных агентов. Они обладают обычно узким спектром действия, низкой иммуногенностью, а также биодеградебельны, что делает их перспективным антибактериальным средством для лечения инфекций, в том числе антибиотикорезистентных.

Бактериофаг RB49 относится к группе T4-подобных фагов, однако цитозин в его ДНК не гидроксиметилирован; кроме того, в отличие от T4, он способен к транскрипции генов. Нами был проведен биоинформационный анализ генома бактериофага RB49, который выявил открытую рамку считывания, кодирующую продукт молекулярной массой 14.7 кДа, аннотированный в геноме как гипотетический белок 102 (p102). На основании сходства последовательности с охарактеризованной нами ранее литической пептидазой бактериофага T5 (38% сходства) мы предположили, что данный белок является пептидогликангидролазой.

Ген p102 длиной 396 п.н. был амплифицирован с помощью ПЦР с геномной ДНК фага RB49 и клонирован в вектор pET30b по сайтам *NdeI* и *XhoI* в клетках *E. coli* XL10 Gold. Получена эффективная экспрессия

гена в клетках *E. coli* BL21(DE3) и C41(DE3); целевой белок был растворим; его продукция составляла не менее 40% от общего белка.

Анализ активности белка показал, что он эффективно лизирует пермеабиллизованные клетки *E. coli*: активность в экстрактах клеток штамма-продуцента составляла  $22,778 \pm 1,120$  Ед/мг, превысив контрольную ( $0,249 \pm 0,014$  Ед/мг) на два порядка. Добавление в реакционный буфер 1 мМ ЭДТА приводило к ингибированию удельной активности до  $2,966 \pm 0,342$  Ед/мг. Это позволяет предполагать, что исследуемый эндолизин является металлоферментом.

Проверка активности эндолизина RB49 на клетках грамположительных бактерий – *Micrococcus luteus* (пептидогликан А2-типа) и *Streptococcus mutans* (пептидогликан А3-типа) – показала, что их пептидогликан не является субстратом для данного фермента. Можно предположить, что фермент специфичен к пептидогликану грамотрицательных бактерий, относящемуся к типу А1.

Работа была поддержана грантом РФФИ № 13-04-00991-а.

#### **T079 БЕЛКИ ХВОСТОВЫХ ШИПОВ БАКТЕРИОФАГОВ – ДЕПОЛИМЕРАЗЫ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ**

**К.А. Мирошников<sup>1</sup>, М.М. Шнейдер<sup>1</sup>, С.А. Бут<sup>2</sup>, А.С. Шашков<sup>3</sup>, Ю.А. Книрель<sup>3</sup>, П.Г. Лейман<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

<sup>2</sup>École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Switzerland

<sup>3</sup>Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва

Сложность лечения внутрибольничных инфекций, вызываемых рядом грамотрицательных условных патогенов, в частности, *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*, объясняется не только множественной устойчивостью к известным антибиотикам, но и склонностью к секреции капсульных и внеклеточных полисахаридов, препятствующих проникновению антибактериальных препаратов в цитоплазму клетки. Некоторые бактериофаги, тем не менее, в ходе инфекции способны преодолевать защитный слой, синтезируемый бактериями. Изучение полисахарид-деполимераз, закодированных геномах фагов, представляет интерес с точки зрения перспективного применения их для контроля и лечения инфекции.

Бактериофаги AP22 (*Myoviridae*) *A. baumannii*, phi297 (*Siphoviridae*) и LKA1 (*Podoviridae*) *P. aeruginosa* при инфекции бактерий-хозяев формируют негативные колонии (бляшки) с широким полупрозрачным ореолом, что свидетельствует о возможном наличии в составе их вирионов белков, разрушающих клеточные экзополисахариды. Нами были получены и очищены рекомбинантные белки хвостовых шипов этих бактериофагов, и посредством рентгеноструктурного анализа определены их структуры. Белки хвостовых шипов всех трех бактериофагов, вне зависимости от морфологии вирусос, представлены тримерными бета-спиралями, в состав которых входит домен связывания с полисахаридом и его ферментативного расщепления. Высокая консервативность пространственной структуры белков хвостовых шипов представителей различных семейств отряда Caudovirales свидетельствует об эволюционной общности хвостатых бактериофагов.

ЯМР-исследования экзополисахаридов штамма 1053 *A. baumannii*, штамма PAO1 *P. aeruginosa*, и продуктов их ферментативной деградации показали, что белки хвостовых шипов бактериофагов деградируют связь по механизму бета-элиминирования и, таким образом, представляют собой специфические полисахарид-лиазы.

### **Т080 ФАГОИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* O157**

**Н.И. Молофеева, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин**  
ФГБОУ ВПО УГСХА им. П.А.Столыпина

В лабораторной практике для ускоренной идентификации бактерий *E. Coli* O157 патогенных для животных и человека микроорганизмов в патологическом материале и объектах внешней среды, предложены индикаторные бактериофаги. Используя строгую специфичность селекционированных нами бактериофагов по отношению к патогенным штаммам *E. Coli* O157 разработали схему ускоренной идентификации этих микроорганизмов и сравнили ее со схемой бактериологического исследования патологического материала, изложенной в действующих «Методических указаниях по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных», утвержденные Департаментом ветеринарии МСХ и П РФ 27.07.2000.

Бульонные культуры, полученные после посева колоний сорбитотрицательных бактерий на сорбитол агаре, микроскопировали (окраска по Грамму) и при наличии в мазках мелких грамотрицательных палочек с закругленными концами, не образующих спор, располагающих одиночно и парно, подвергали фаготипированию методом «стекающая капля».

Для этого на поверхность МПА в чашках Петри пастеровской пипеткой наносили 3-4 капли бульонной 18-часовой культуры исследуемых микроорганизмов. Нанесенную культуру равномерно распределяли по поверхности среды стерильным шпателем. Чашки ставили в термостат для подсушивания на 15–20 минут, затем чашку делили на три сектора и на поверхность засеянной среды пастеровской пипеткой легким прикосновением капли на два сектора наносили по одному штамму фага, на третий сектор в качестве контроля наносили стерильный МПБ, наклоняли чашку, чтобы капли стекли. Чашки оставляли для подсушивания в боксе на 15–20 минут и помещали в термостат в перевернутом виде на 18–20 часов при 37 С.

Результат исследований считали положительным, если на месте нанесения одного или трех штаммов фагов на газоне сплошного роста культуры образовывалась прозрачная зона лизиса с вторичным ростом фагорезистентных микроорганизмов или без него, а также рост негативных колоний фага. При положительном результате культуру относили к виду *E. Coli* O157. В результате проведенных исследований из всех 12 проб фекалий были выделены исходные культуры эшерихий, принадлежащих к серогруппе O157, о чем свидетельствовали результаты изучения их ферментативных и антигенных свойств.

Предложенный нами метод по идентификации бактерий позволяет идентифицировать *E. coli* O157 за 48 часов (2 суток), тогда как срок бактериологического исследования составил 120 часов (5 суток) при большей затрате посуды и реактивов.

### **Т081 ЛАТИНОАМЕРИКАНСКОЕ- СРЕДИЗЕМНОМОРСКОЕ СЕМЕЙСТВО *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* И ЕГО СУБЛИНИИ В СЕВЕРНОЙ ЕВРАЗИИ И В ГЛОБАЛЬНОМ КОНТЕКСТЕ**

**И.В. Мокроусов**

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера,  
Санкт-Петербург, Россия

Вид *Mycobacterium tuberculosis* имеет клональную структуру и Латиноамериканское-Средиземноморское генетическое семейство (Latin-American Mediterranean, LAM) является одним из крупнейших и широко распространенных в мире, и характеризуется интересной патобиологией и запутанной филогенией. Метод сполитотипирования все еще часто используется для определения LAM, но ограничениями этого метода являются анализ одного локуса и возможность его конвергентной эволюции. Мы применили надежные филогенетические маркеры для изучения эволюции LAM и его основных сублиний в Северной Евразии и Восточной Азии. 250 изолятов *Mycobacterium tuberculosis* были определены как LAM на основе анализа SNP в *Rv3062* и *Rv0129c*. Статус семейства был исправлен для 121 изолята, ошибочно отнесенных на основе сполитотипирования к семействам T1 и T5-RUS1. В результате, доля LAM увеличилась в два раза в России и Казахстане и в четыре раза в Беларуси. Большинство (91.8–98.7%) штаммов LAM во всех трех странах принадлежало подсемейству LAM-RUS (входящему в сублинию RD115). Иbero-американская сублиния LAM RD-Rio была выявлена только у 7 российских изолятов (из Санкт-Петербурга, Калининграда и Карелии). Доля LAM составила <1% в китайской популяции (2 из 709 штаммов), при этом один изолят представлял сублинию RD115, а изолят сублинии RD-Rio/RD174 был выделен в Тибете.

Наши результаты и дальнейший анализ позволили нам предложить теорию о монофилетическом происхождении LAM-RUS: в исторически далекое время, в России, в небольшой бактериальной/человеческой популяции. Его разнообразие и распространение в Северной Евразии может указывать на долгосрочное сосуществование LAM-RUS и местных популяций человека. Сублиния LAM RD-Rio распространена в Иbero-Американском и Карибском регионах мира, где она, вероятно, и возникла и первоначально распространилась. Она также выявляется в заметной доле штаммов в странах с высокой иммиграцией из этих регионов (например, США и Нидерландах), и резко снижается в области исторического распространения сублинии LAM-RUS. Редкие изоляты LAM RD-Rio вероятно попали в Россию через случайные человеческие контакты. Распространение штаммов LAM RD-Rio не столь глобально, как утверждают, и во многом определяется человеческими миграционными потоками (а не патобиологическими свойствами этих штаммов). Следовательно, генетика человека по-видимому, играет важную роль в формировании локального распространения импортируемых штаммов в автохтонной популяции.

### **Т082 ТУБЕРКУЛЕЗ КАК НОЗОКОМИАЛЬНАЯ ИНФЕКЦИЯ**

**Е.Б. Мясникова, Н.Р. Сагиева**

ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России Санкт-Петербург,  
Россия

Туберкулез, как нозокомиальная инфекция до сих пор остается недостаточно изученным заболе-

ванием. Несмотря на очевидную актуальность проблемы, система эпидемиологической диагностики нозокомиальной туберкулезной инфекции до настоящего времени является нерешенной задачей, как в научно-методическом, так и в практическом отношении.

В качестве основного индикатора эффективности системы инфекционного контроля в противотуберкулезных медицинских организациях используется показатель профессиональной заболеваемости туберкулезом сотрудников учреждений. При всей важности и безусловной социальной, медицинской и правовой значимости данного показателя он не может в достаточной степени отражать все аспекты деятельности противотуберкулезного учреждения по обеспечению безопасности больничной среды.

В результате специальных исследований, проведенных в противотуберкулезных учреждениях России и за рубежом, было показано, что госпитализация в противотуберкулезный стационар является одной из причин повторного заражения пациентов туберкулезом. Частота повторного инфицирования, выявленная и подтвержденная с использованием методов молекулярно-генетических исследований (МГИ), может составлять от 5,26 [1,09–15,39] в отделениях для лечения пациентов с туберкулезом, вызванным возбудителем с множественной лекарственной чувствительностью, до 25,2 [16,9–36,99] на 100 пациентов в противотуберкулезных отделениях для больных ВИЧ-инфекцией.

Клинические проявления случаев повторного заражения туберкулезом у пациентов противотуберкулезных учреждений могут протекать в форме обострения или рецидива. Было отмечено, что микобактериям, являющимся потенциальными этиологическими агентами нозокомиальных вспышек, свойственна высокая вирулентность, ассоциированная с высокой трансмиссивностью и способностью к кластерообразованию.

Таким образом, в условиях роста популяции лиц, инфицированных ВИЧ, на фоне широкой циркуляции штаммов микобактерий туберкулеза, обладающих множественной лекарственной устойчивостью, меры инфекционного контроля в противотуберкулезных учреждениях приобретают первостепенное значение. В этой связи обеспечение безопасных условий пребывания пациентов и персонала в противотуберкулезных учреждениях следует рассматривать не только с позиций интересов конкретной противотуберкулезной медицинской организации, но и как один из ключевых элементов, способствующих стабилизации эпидемической ситуации в целом.

Для полноценного функционирования системы эпидемиологической диагностики нозокомиального туберкулеза требуется адекватная микробиологическая диагностика, сочетающая микробиологические и молекулярно-генетические методы исследований. Весьма целесообразным представляется создание персонифицированного регистра всех случаев туберкулеза, включающего (при наличии культуры микобактерии туберкулеза) результаты МГИ – сполитипирования и/или полногеномного секвенирования ДНК.

### **T083 БИОСИНТЕЗ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ И ГЛИКОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ПРОБИОТИЧЕСКИМИ ШТАММАМИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ И БИФИДОБАКТЕРИЙ**

**И.А. Найденко<sup>1</sup>, Н.А. Головнева<sup>1</sup>, М.Е. Сафонова<sup>1</sup>, В.В. Денисенко<sup>1</sup>, Е.А. Семенчукова<sup>1</sup>, Д.С. Балпанов<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>Филиал РГП «Национальный центр биотехнологий»

Молочнокислые и бифидобактерии, как важные представители микробиоценоза желудочно-кишечного тракта человека и животных, до настоящего времени остаются одними из наиболее часто используемых микроорганизмов в качестве основы препаратов-пробиотиков для медицины, ветеринарии, пищевой промышленности. Необходимым условием активного роста и развития, реализации пробиотического потенциала микробных культур является согласованное функционирование ферментных систем, в первую очередь белкового и углеводного обмена. В этой связи актуальным является оценка продукции протеолитических и гликолитических ферментов штаммами молочнокислых и бифидобактерий, перспективных для использования в составе биопрепаратов пробиотического действия.

У исследуемых пяти штаммов бактерий р. *Lactobacillus* и штамма р. *Bifidobacterium* были обнаружены связанные с бактериальной клеткой ферменты протеолитического и пептидазного комплекса, α- и β-галактозидазы. Установлено, что по продукции лейцинаминопептидаз изучаемые лактобациллы в 1,2–4 раза превосходили бифидобактерии, в то время как штамм *Bifidobacterium sp.* 1 проявлял самую высокую среди всех исследуемых микроорганизмов пролинаминопептидазную активность. В клеточных суспензиях четырех из пяти изучаемых лактобацилл пролинаминопептидазы практически отсутствовали.

По накоплению связанных с клеточной поверхностью протеолитических ферментов штаммы р. *Lactobacillus* различались в 1,7–2,7 раза.

Выявлена высокая вариабельность (различия в 5–100 раз) исследуемых культур по способности продуцировать α-галактозидазы. α-галактозидазная активность в клеточных суспензиях бифидобактерий достигала 0,26 ед/г, что в 13 раз превышало и в 10 раз было ниже показателей наименее и наиболее активных штаммов лактобацилл соответственно.

Все изучаемые молочнокислые и бифидобактерии при росте на среде с лактозой накапливали α-галактозидазы с активностью 0,07–0,32 ед/г в зависимости от штаммовой принадлежности.

Выявленные штаммовые различия лактобацилл и бифидобактерий по исследуемым параметрам важны при подборе культур в состав комплексных препаратов пробиотического действия.

### **T084 РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ В ФОРМАТЕ ИММУНОЧИПА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgG-АНТИТЕЛ К ЦМВ**

**А.В. Никитина, В.Г. Помелова, Н.С. Осин, С.Г. Марданлы**

ФГУП «ГосНИИБП», г. Москва, Россия

ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск, Россия

Цель настоящей работы — на модели цитомегаловируса (ЦМВ) продемонстрировать возможность использования метода ФОСФАН для выявления

противовирусных IgG-антител. Определение IgG-антител проводили с помощью иммунофлуоресцентной тест-системы в формате иммуночипа, представляющего собой 96-луночный микропланшет, на дне лунок которого были иммобилизованы специфические антигены ЦМВ (gB, pp65, pp150) в виде отдельных микрозон диаметром 0,5 мм. В процессе работы было исследовано 400 образцов сыворотки крови, в том числе 217 проб, содержащих, и 183 пробы, не содержащих антитела класса G к ЦМВ (по данным ИФА с тест-систем «CMV-IgG-ELISA», Medac и «ИФА-ЦМВ-IgG», ЗАО «ЭКОлаб»). Стадии анализа включали инкубацию проб в лунках микропланшета, промывку лунок и последующее связывание образовавшегося комплекса «антиген-антитело» со вторым биоспецифическим реагентом (антителами, конъюгированными с биотином). «Проявление» иммунной реакции осуществляли с помощью конъюгата стрептавидина с копропорфирином платины. Детекция результатов анализа осуществлялась с помощью флуоресцентного биочип-анализатора, разработанного в ГосНИИБП. Интенсивность сигнала, измеряемая числом фотоимпульсов от каждой микрозоны, пропорциональна концентрации антитела в ней.

При выявлении IgG-антител к ЦМВ с помощью иммуночипа были продемонстрированы различные показатели клинической чувствительности и специфичности для разных антигенов ЦМВ. Исходя из полученных результатов, наилучшее соотношение между значениями чувствительности и специфичности иммуночипа были достигнуты при использовании антигена pp150 (89% и 93% соответственно). Таким образом, была показана принципиальная возможность применения метода ФОСФАН при создании иммуночипа для выявления IgG-антител к ЦМВ. При этом созданная модель иммуночипа может быть использована при разработке мультиплексной тест-системы для одновременной детекции специфических антител к возбудителям группы инфекций, например, ToRCH-комплекса.

#### **Т085 НОВЫЙ ТРАНСПОЗОН STREPTOCOCCUS PYOGENES, СОДЕРЖАЩИЙ ГЕН УСТОЙЧИВОСТИ К ТЕТРАЦИКЛИНУ, И ЕГО РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ НА СЕВЕРО-ЗАПАДЕ РОССИИ И В СТРАНАХ ЮГО-ВОСТОЧНОЙ АЗИИ**

А.Г. Носик<sup>1</sup>, Е.М. Полякова<sup>2</sup>, Ф.К. Линь<sup>3</sup>, А.В. Дмитриев<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия  
<sup>2</sup>ФГБУ «РНИИТО им. Р.Р. Вредена», Санкт-Петербург, Россия  
<sup>3</sup>Совместный Российско-Вьетнамский тропический научно-исследовательский и технологический центр, Ханой, Вьетнам

*Streptococcus pyogenes* (стрептококк группы А) — патогенный микроорганизм, вызывающий многочисленные заболевания человека, включая тяжелые инвазивные формы инфекций. Лечение стрептококковых заболеваний часто бывает неэффективным по причине устойчивости *S. pyogenes* к различным антибактериальным препаратам. Недавно нами у *S. pyogenes* был обнаружен транспозон (Tn), ранее встречающийся лишь у *Streptococcus pneumoniae*, который содержал ген *tetM* устойчивости к тетрациклину (Tc).

В данной работе проанализированы следующие штаммы *S. pyogenes*: 51 штамм, выделенный в Китае в 2007 г. (типы *emm1* и *emm12*), 35 штаммов, выделенные в Санкт-Петербурге в 2007–2008 гг. (типы *emm1*

и *emm12*), и 44 штамма различных типов (*emm1*, *emm4*, *emm12*, *emm104*, *emm109* и др.), выделенные во Вьетнаме в 2012–2014 гг. Наличие Tn определяли по наличию маркерного RAPD фрагмента размером 536 п.н., а также фрагментов генов Tn SPT\_1906, 1907, 1915, 1916, 1931 и *tetM*. Устойчивость к Tc выявляли диско-диффузионным методом. Степень генетического родства штаммов определяли методом электрофореза ДНК в пульсирующем электрическом поле.

Гены Tn были обнаружены среди всех *emm*-типов *S. pyogenes*, в том числе, у 14,3% штаммов, выделенных в Санкт-Петербурге, и у 100% штаммов, выделенных в Китае и Вьетнаме. Наличие гена *tetM* и устойчивость к действию Tc не всегда коррелировали с наличием других генов Tn у штаммов, выделенных в Санкт-Петербурге и Китае. Однако у 100% штаммов, выделенных во Вьетнаме, наличие гена *tetM* всегда коррелировало с наличием других генов Tn. При этом большинство штаммов, выделенных во Вьетнаме, были устойчивы к действию Tc.

У 3 штаммов, выделенных в Санкт-Петербурге, Tn был обнаружен между хромосомными генами *Spy\_0237* и *Spy\_0238*. В то же время, ни у одного из 44 штаммов, выделенных во Вьетнаме, Tn не был обнаружен в этом месте генома, и очевидно он имеет иную локализацию. Вьетнамские штаммы не являлись близкородственными, принадлежали к различным *emm*-типам и различным генетическим линиям. Наличие у 100% из них вышеупомянутого Tn может свидетельствовать либо об эволюционно древнем приобретении Tn, либо о быстром непрекращающемся процессе приобретения Tn штаммами *S. pyogenes* от *S. pneumoniae* в условиях их биоценоза в ротовой полости.

Таким образом, очевидна необходимость пристального контроля эпидемической обстановки и заболеваемости стрептококковыми инфекциями, учитывая миграцию населения и развивающуюся индустрию туризма в Юго-Восточной Азии.

#### **Т086 РОЛЬ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ СИМБИОТИЧЕСКОЙ МИКРОБИОТЫ ЧЕЛОВЕКА**

А.В. Олескин<sup>1</sup>, А.М. Амерханова<sup>2</sup>, О.Г. Жиленкова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии  
им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия

Симбиотические микроорганизмы заселяют различные ниши на поверхности и внутри тела животного или человека, в том числе желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) и в особенности толстый кишечник. В норме микрофлора кишечника выполняет ряд важных функций, так что её рассматривают как особый «микробный орган», напоминающий печень по многообразию функций. Она, в частности, снабжает организм полезными соединениями типа витаминов (например, группы B), короткоцепочечных жирных кислот, а также нейромедиаторов ЦНС. Поэтому нормальное функционирование нейробиохимических систем мозга, как становится всё более очевидным, зависит не только от самого организма человека, но и от его микрофлоры.

Микрофлора человека как чуткий камертон отзывается на изменения в физиологическом и даже психологическом состоянии ее хозяина. Интересные данные были получены по влиянию стресса

на состояние симбиотической микрофлоры. В эксперименте стресс, вызванный изоляцией двадцати 6–9-месячных детёнышей макак от матерей, привел к достоверному снижению числа лактобацилл в их экскрементах, что сопровождалось относительным повышением доли патогенных бактерий (родов *Shigella*, *Campylobacter*).

Нейромедиаторы, в частности, катехоламины стимулируют рост микробиоты, например, симбионта *E. coli* K-12. Катехоламины явно различались, по нашим данным, по своему эффекту на соотношение между численностью одиночных клеток и их компактных групп в культуре *E. coli* на плотной питательной среде, к которой добавляли тот или иной амин в момент инокуляции. Это соотношение нарастало по сравнению с контролем в случае дофамина и снижалось при добавлении норадреналина. Получены также данные о стимуляции серотонином и особенно гистамином в микромолярных концентрациях пролиферации клеток и формирования микроколоний у *E. coli* K-12. В литературе описано регуляторное воздействие нейропептидов (динорфина) и окиси азота на микробиоту.

Воспринимающие нейромедиаторы рецепторные системы у микрофлоры ЖКТ могут служить химическому диалогу между микроорганизмами и организмом-хозяином, выбрасывающим катехоламины и нейропептиды в ответ на инфекцию в кровоток, из которого они попадают в достаточно высоких концентрациях в просвет кишечника.

Рассмотренные в настоящем сообщении роли нейромедиаторов в приложении к микроорганизмам, а также их участие в коммуникации между симбиотической микрофлорой и макроорганизмом-хозяином представляют собой часть проблематики нового научного направления – микробной эндокринологии.

### **Т087 ЭФФЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ ЛАНТАНА НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ**

Д.С. Орлов<sup>1,3</sup>, О.В. Шамова<sup>1,3</sup>, А.Ю. Артамонов<sup>1</sup>, С.Б. Орлов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «НИИ Экспериментальной Медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Саратовский Государственный Медицинский Университет, Саратов, Россия

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

Одна из проблем экологии связана с тем, что соединения искусственного происхождения внедряются в технологические процессы и медицину быстрее, чем накапливаются знания об их биологической активности. Недавно внедрены в медицинскую практику препараты на основе редкоземельных элементов, встречающихся в природе в следовых количествах, например, регулятор уровня фосфатов на основе лантана, контрастные вещества – соли гадолиния. Целью настоящей работы было изучение эффектов действия лантана на биологическую активность антимикробных пептидов системы врожденного иммунитета. Антимикробные катионные пептиды (АП) – соединения, составляющие молекулярную основу врожденного иммунитета. Представители различных семейств антимикробных пептидов обладают различной селективностью антимикробного действия. АП присуща высокая антимикробная

активность, в том числе, в отношении резистентных к фармакологическим препаратам штаммов. Действие АП на бактериальные клетки зависит от присутствия дивалентных катионов ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ). Замещение пептидами дивалентных катионов в структуре мембран необходимый этап их бактерицидного действия. В последнее время появились препараты, содержащие редкоземельный металл лантан ( $La^{3+}$ ). Атомный радиус трехвалентного лантана ( $La^{3+}$ ) незначительно отличается от атомного радиуса дивалентного кальция ( $Ca^{2+}$ ), а заряд выше, что указывает на большее сродство к мишеням связывания.

С помощью маркеров жизнеспособности бактерий (ресазурин) и индикаторов структурной целостности мембран (Nitrocefin и ONPG) установлено, что в присутствии лантана антимикробная активность протегрина – одного из самых активных АП природного происхождения – была снижена или отсутствовала. Нарушение барьерной функции внутренней мембраны бактерий, основа антибиотической активности протегрина, предотвращалось в присутствии от 5 мкМ лантана. Сам лантан ( $La^{3+}$ ) в концентрации от 1 мкМ вплоть до 160 мкМ не проявлял антимикробной активности. Полученные результаты позволяют предположить, что подобный эффект лантана связан с его способностью замещать  $Ca^{2+}$  в составе бактериальных мембран, образуя более устойчивые к действию АП комплексы. Таким образом, применение в медицине лантаноидов нуждается в дальнейшем изучении с точки зрения их возможного негативного влияния на молекулярно-клеточные защитные механизмы врожденного иммунитета.

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-02102а.

### **Т088 МИКОБАКТЕРИОЗ, ВЫЗВАННЫЙ НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫМИ МИКОБАКТЕРИЯМИ, И ЕГО ВЗАИМОСВЯЗЬ С ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДОЙ**

Т.Ф. Оттен<sup>1</sup>, Е.Б. Мясникова<sup>1</sup>, Н.Г. Матвеева<sup>2</sup>, И.В. Тарасова<sup>3</sup>, Н.А. Гончаренко<sup>4</sup>

<sup>1</sup>СПб НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>ГБУЗ ПТД СПб, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>ГБУЗ Архангельский областной клинический ПТД, Архангельск, Россия

<sup>4</sup>БУЗ Вологодский областной ПТД, Вологда, Россия

Заболевания микобактериозом, вызванные нетуберкулезными микобактериями (НТМБ), широко распространены во всем мире. Повсеместно отмечается увеличение числа этих заболеваний, которое имеет различные причины. По данным лаборатории СПбНИИФ заболеваемость микобактериозом в СПб за последние 5 лет возросла в 18 раз (с 0,04 до 0,73 случаев на 100 000 населения).

Одна из причин значительного увеличения выделения НТМБ связана с улучшением технического обеспечения бактериологических лабораторий (автоматизированные системы ВАСТЕС 960 и 9050, внедрение молекулярно-генетических методов). В СПб за период с 2006 по 2013 г. удельный вес НТМБ среди всех, выделенных микобактерий за год, возрос с 0,3% до 2,0%

НТМБ – условно-патогенные микобактерии, следовательно, изменения, происходящие в окружающей среде, приводят к изменению взаимоотношений между макро- и микроорганизмом. Возможной причиной роста заболеваемости мико-

бактериозом может служить увеличение доли населения преклонного возраста (от 73 лет) – от 8,21% (2012 г.) до 9,22% (2014 г.). По данным зарубежных исследований микобактериозом болеют лица старшей возрастной группы. Среди находящихся под нашим наблюдением больных микобактериозом без ВИЧ-инфекции преобладали лица старше 60 лет (57,6%).

Роль окружающей среды четко прослеживается в увеличении или снижении случаев заболеваемости микобактериозом в отдельном регионе. Так, в 1981–1990 гг. при случайной выборке больных микобактериозом легких десятки случаев заболевания было зарегистрировано в центре тяжелой металлургии (г. Череповец). Благодаря налаженной системе экологического менеджмента на заводе Северсталь улучшено состояние окружающей среды, как на предприятии, так и на прилегающей территории – за период с 2003 по 2013 гг. зарегистрирован всего 1 случай микобактериоза.

В период с 12.12.2013 г. по 06.02.2014 г. у 3 пациентов одного отделения туберкулезного стационара из диагностического материала было выделено 6 штаммов *M. Gordonae* – микобактериального сапрофита, первоначально выделенного из водопроводной воды. Санитарно-бактериологическое обследование, посева водопроводной и питьевой воды дали отрицательные результаты. Источник инфицирования диагностического материала установить не удалось, однако после проведения санитарно-эпидемиологического обследования и профилактических мероприятий контаминации диагностического материала *M. gordonae* не наблюдалось.

Приведены примеры влияния окружающей среды на состояние здоровья человека.

## Т089 ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОМА БАКТЕРИОФАГОВ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*

Т.А. Пилипчук, Г.И. Новик

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Фитопатогенные бактерии рода *Pseudomonas* причиняют существенный ущерб сельскому хозяйству, вызывая различные заболевания, поражающие ценные сельскохозяйственные культуры. Применяемые химические средства защиты растений небезопасны в экологическом отношении и малоэффективны в связи с развитием устойчивых к ним штаммов бактерий. К одному из подходов биологического контроля заболеваний растений относится использование бактериофагов. Важным критерием таксономической принадлежности вирусов бактерий является характеристика их генома при обработке рестрикционными эндонуклеазами. Для характеристики ДНК фагов Pf-9, Pf-10, Pf-11 и Pf-12, вирулентных в отношении фитопатогенных бактерий *Pseudomonas*, использовали рестриктазы EcoRI, BamHI и HindIII.

Гидролиз фаговых нуклеиновых кислот рестриктазой EcoRI позволил выявить, что некоторые фаги схожи между собой по количеству и молекулярной массе образующихся рестриктов. Так ДНК бактериофагов Pf-10 и Pf-11 расщепилась на два фрагмента примерно одинаковой молекулярной массой. ДНК фагов Pf-9 и Pf-12 порезались на 6 фрагментов различной молекулярной массой от 23 000 п.н. до 850

п.н. Тот же анализ с использованием рестриктазы HindIII показал, что ДНК штаммов бактериофагов Pf-9 и Pf-10 идентичны и имеют 6 рестриктов от 23 000 п.н. до 3 000 п.н.; ДНК фагов Pf-11 и Pf-12 также схожи и имеют 5 фрагментов. При воздействии рестриктазой BamHI было обнаружено, что ДНК фага Pf-12 не расщепляется данной нуклеазой; ДНК бактериофагов Pf-9 и Pf-10 идентичны и имеют 5 рестриктов от 23 000 п.н. до 4 800 п.н., а ДНК фага Pf-11 разделяется на три фрагмента: 17 000, 11 000 и 10 000 п.н.

При электрофоретическом разделении рестриктазами Eco136II, Eco47III, Eco147I, HincII, KspAI, TaqI молекул ДНК фагов Pf-11 и Pf-12 была выявлена идентичность по рестриктазам Eco47III (8 рестриктов), HincII (6 фрагментов), KspAI (4 фрагмента) и TaqI (5 фрагментов). Рестриктазы KpnI, SalI, ScaII, SmaI, XbaI, XhoI не обладали активностью к ДНК штаммов Pf-10, Pf-11 и Pf-12.

Исходя из полученных данных видно, что для групп бактериофагов имеется сходство в отдельных участках электрофореграммы. Подобная рестрикционная картина объяснима горизонтальным переносом генов между негомологичными аллелями в ходе эволюции бактериофагов.

## Т090 БАКТЕРИОФАГИ В СИСТЕМЕ МЕРОПРИЯТИЙ ПО БОРЬБЕ С ПУЛЛОРОЗОМ КУР

Н.В. Пименов<sup>1</sup>, С.В. Ленеv<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО МГАВМиБ, Москва, Россия

<sup>2</sup>ФГБУ «ВГНКИ», Москва, Россия

Пуллороз-тиф птиц, обусловленный *Salmonella gallinarum*, наносит значительный ущерб птицеводству. Трансовариальный путь передачи возбудителя становится причиной массовой заболеваемости цыплят в возрасте от 5 до 14 суток, гибель птиц достигает 70% и более. На фоне растущей антибиотикорезистентности сальмонелл и скрытого бактерионосительства при инфекции *Salmonella gallinarum* востребовано применение средств специфической санации организма птиц от возбудителя. Сотрудниками ВГНКИ в 1998 г. был разработан сальмофаг пуллорум, объединивший в себе аттенуированный штамм *S. gallinarum* Т 10 и бактериофаги, высокоактивные против эпизоотических штаммов сальмонелл, вызывающих пуллороз-тиф кур и других птиц, при этом не действующие на вакцинный штамм. Испытания в лабораторных условиях показали высокий терапевтический и ранний профилактический эффект препарата сальмофаг пуллорум, созданного на основе штаммов фагов с высокой литической активностью, широким спектром действия и высокой урожайностью. Установлено, что сальмофаг обладает выраженными профилактическими и лечебными свойствами за счет фагового компонента при инфицировании цыплят яичных кроссов и бройлеров двух- и пятидневного возраста в дозе 7LD<sub>50</sub>, 12LD<sub>50</sub> и 20LD<sub>50</sub> вирулентных штаммов *S. gallinarum-pullorum* в лабораторных условиях. Сохранность поголовья в опытных группах составила 100% при полной летальности в контроле. Тем не менее, опыт применения фагов в производственных условиях неблагополучных по пуллорозу птицефабрик остается малоизученным.

На одной из птицефабрик, несмотря на применение антибиотиков (энфтрофлоксацин, левомицетин, гентамицин), наблюдалась гибель цыплят 7-10-су-



точного возраста, достигавшая 57%. При бактериологическом анализе патматериала от птицы и эмбрионов-задохликов от племенных несушек выделены изоляты *Salmonella gallinarum*.

К выделенным изолятам сальмонелл, из коллекции ВГНКИ подобраны бактериофаги, имеющие титр по Аппельману  $10^{10}$ . На основе высокоактивных фагов *Phagum S. gallinarum* изготовлен препарат. Препарат бактериофага на птицефабрике выпаивали цыплятам двукратно, с питьевой водой в возрасте 1 и 5 суток, из расчета  $10^8$  фаговых частиц на цыпленка. Применение препарата предотвращало вспышку заболевания и гибель цыплят. Отход по группам к 20-суточному возрасту составлял от 2,3 до 7,1 %. При исследовании материала от павших цыплят сальмонеллу не выделяли, были установлены другие причины падежа (*E. coli*, *Enterococcus spp.*). При этом отход цыплят в группах, не получавших бактериофаг составлял в среднем 54%. Более низкую эффективность от применения фагов отмечали при полном содержании взрослой птицы в птичниках, где не проводилась смена подстилки и санация помещений. Двукратное применение препарата курам-несушкам не полностью предотвращало трансвариальную передачу возбудителя, который выявлен у их потомства.

Таким образом, применение фагов на неблагополучной птицефабрике оказалось эффективным для профилактики эпизоотической вспышки пуллороза у цыплят, но не полностью предотвращало трансвариальную передачу возбудителя у племенного птицепоголовья несушек. Эффективная система мероприятий против пуллороза птиц в неблагополучном хозяйстве должна включать выбраковку положительно реагирующей в ККРНГА племенной птицы, проведение ветеринарно-санитарных мероприятий с обязательной санацией помещений, применение высокоактивных фагов цыплятам на 1-2 и 4-6 сутки жизни.

### **T091 ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА – ТОЧКА ЗРЕНИЯ ХИМИКА**

**Л.Б. Пиотровский**

*НИИЭМ СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия*

В настоящее время в литературе одним из путей профилактики и лечения различных заболеваний рассматривается персонализированная медицина, основоположником которой принято считать Кевина Джайна. Согласно Джайну, цель персонализированной медицины состоит в том, чтобы найти подходящее лекарство для конкретного больного и в некоторых случаях даже разработать схему лечения больного в соответствии с его геномом. В более широком смысле персонализированная медицина представляет собой интегральную медицину, которая включает разработку персонализированных средств лечения на основе геномики, тестирование на предрасположенность к болезням, профилактику, объединение диагностики с лечением и мониторинг лечения. Можно сказать и так, что цель персонализированной медицины заключается в правильной диагностике и правильном лечении данного пациента в правильное время за правильной цене.

Очевидно, что люди отличаются генетически и эпигенетически. Кроме того, на состояние организма существенно влияет окружающая именно его

среда. Однако создание новых препаратов совершенно не учитывает эти различия, и в реальности при испытаниях для выпуска новых препаратов-блокбастеров (продажа которых приносит не менее \$1 млрд. в год) гетерогенная популяция биологических особей (больных, испытуемых и т.п.) усредняется.

Но персонализированная медицина требует персонального подбора лекарства для каждого пациента. Тем самым она требует изменения «блокбастерного» менталитета. И совершенно очевидно, что наступление эры персонализированной медицины означает, что кончается век препаратов-блокбастеров, а на арену выходят препараты-орфаны.

Поэтому реальные успехи персонализированной медицины, как методологии медикаментозного лечения заболевания на основе знания биологических особенностей человека, назначение конкретного лекарства конкретному больному (индивиду) на основании фармакокинетических и фармакогенных сведений, невозможно без химиков, занимающихся синтезом новых лекарственных веществ. Необходима разработка новых методологий синтеза и анализа, создание и внедрение в практику препаратов нового типа, соединяющих в себе как диагностическое, так и терапевтическое начала, т.е. препаратов-тераностиков.

И тут для химиков отрывается обширнейшее поле деятельности. И наступает кошмар для фармакологов, особенно клинических.

### **T092 РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

**А.В. Попова<sup>1,2</sup>, Н.В. Воложанцев<sup>1</sup>, В.П. Мякинина<sup>1,2</sup>, В.М. Красильникова<sup>1,2</sup>, В.В. Вережкин<sup>1,2</sup>, В.А. Баннов<sup>1,2</sup>, А.А. Кисличкина<sup>1</sup>, А.Г. Богун<sup>1</sup>, А.В. Алешкин<sup>2,3</sup>, Э.А. Светоч<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболensk

<sup>2</sup>ООО Бифаг, Москва

<sup>3</sup>ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского

Проблема нозокомиальных инфекций с каждым годом приобретает всё большую медицинскую и социальную значимость. Во многих странах наблюдается рост инфекционной заболеваемости в стационарах лечебных учреждений, что существенным образом связано с распространением штаммов микроорганизмов, устойчивых к различным антибактериальным препаратам.

Применение литических бактериофагов – один из возможных путей решения серьёзной терапевтической проблемы, которую представляют внутрибольничные инфекции.

Для контроля нозокомиальных инфекций, вызванных *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*, разработан экспериментальный препарат, включающий несколько различных фагов против каждого патогена.

Бактериофаги были выделены из образцов сточных вод, клинического материала, и смывов с поверхностей внутрибольничной среды.

Для выделенных фагов были определены морфология негативных колоний и фаговых частиц, параметры инфекционного процесса, стабильность при воздействии различных физико-химических факторов и спектры литического действия. Установлено, что фаги специфически инфицируют и лизируют

75 % из 85 клинических штаммов *A. baumannii*, 100 % из 35 — *K. pneumoniae*, 85 % из 40 — *S. aureus*, и 50 % из 35 — *P. aeruginosa*.

Получены данные о структуре фаговых геномов, представленных двунитевой ДНК. В геномах не идентифицировано ни одного гена, кодирующего пептиды, подобные токсинам или каким-либо известным факторам вирулентности, а также гены, определяющие умеренный путь развития фага.

Проведена оценка токсичности фагового препарата для лабораторных мышей.

С учетом микробиологического, геномного и биоинформационного анализов выделенных фагов, полученный экспериментальный препарат перспективен для контроля наиболее значимых возбудителей внутрибольничных инфекций.

### **T093 РАСПОЗНАВАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ N4-ПОДОБНЫМИ КОЛИФАГАМИ**

**Н.С. Прохоров<sup>1</sup>, К. Риччио<sup>2</sup>, А.К. Голомидова<sup>1</sup>, Е.Е. Куликов<sup>1</sup>, П.Г. Лейман<sup>2</sup>, А.В. Летаров<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ИНМИ им. С.Н. Виноградского РАН

<sup>2</sup>École Polytechnique Fédérale de Lausanne

В течение нескольких десятилетий после открытия бактериофаг N4 был единственным представителем своего рода, однако благодаря уникальным особенностям биологии оставался предметом интенсивных исследований. За последние несколько лет было изолировано более двадцати N4-подобных бактериофагов, инфицирующих представителей различных групп протеобактерий. Нами были выделены несколько близкородственных N4-подобных колифагов из симбиотического сообщества лошадей и определены их полные геномные последовательности. Бактериофаги G7C и Alt63, как и большинство известных представителей рода, в модуле генома, предположительно ответственном за адсорбцию вируса на клеточной поверхности, содержат два гена (ORF63.1 и ORF66 в G7C; ORFA63.1 и ORF66 в Alt63), гомологичных хвостовым шипам представителей всех трёх семейств хвостатых фагов. Биохимические и структурные исследования рекомбинантных продуктов этих генов показали, что все они формируют хвостовые шипы с различными функциями. gp63.1 фага G7C и его аналог gpA63.1 в Alt63 обладают ферментативными активностями в отношении O-антигена чувствительных клеток и отвечают за взаимодействие с первичным клеточным рецептором. gp63.1 содержит SGNH-эстеразный домен и осуществляет деацетилирование липополисахаридов, в то время как gpA63.1 представляет собой деполимеразу. gp66 присутствует в обоих вирионах, образует *in vitro* комплексы с gp63.1 и gpA63.1 и имеет домен прикрепления к вирусному хвосту. gp66 обеспечивает необратимое связывание комплексов с клеточной поверхностью.

Подовирусы с разветвленными адгезинами были исследованы прежде. У фага K1-5 два разных хвостовых шипа участвуют в первичном распознавании двух различных капсульных штаммов *E. coli*. Таким образом, присутствие двух шипов в вирионе служит для расширения спектра потенциальных хозяев вируса. На основании полученных данных мы предлагаем модель распознавания клеточной поверхности N4-подобными колифагами G7C и Alt63, согласно которой первый шип gp63.1 и gpA63.1, соответственно, распознает O-антиген клеточной стенки в качестве первичного рецептора и, ферментативно

модифицируя его, обеспечивает продвижение вируса к наружной мембране. Второй шип gp66 обеспечивает необратимое связывание с клеткой за счет взаимодействия со вторичным рецептором — белком наружной мембраны.

### **T094 ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВИРУСОВ ALT63 С ЧУВСТВИТЕЛЬНЫМИ ШТАММАМИ E. COLI**

**Н.С. Прохоров, Е.В. Татарский, Е. Гурко, А.К. Голомидова, А.В. Летаров**

ИНМИ им. С.Н. Виноградского РАН

Колифаг Alt63 был обнаружен в нашей лаборатории в качестве минорного компонента при полном геномном секвенировании препарата фага G7C, полученного на полевом изоляте *E. Coli* 4S. Выделить фаг Alt63 в чистом виде удалось с помощью устойчивого к G7C мутантного клона 4S с инактивированным геном *wclK* — геном ацетилтрансферазы из O-антигенного кластера, ответственной за специфическое ацетилирование O-антигенного звена 4S. Геномное секвенирование полученного изолята, выявило практически полное совпадение последовательностей геномов выделенного фага и фага G7C по всей длине, кроме адсорбционного модуля, в котором вместо присутствующего в G7C гена 63.1, ответственного за первичное распознавание клеток и энзиматическую модификацию клеточного O-антигена, присутствует ген A63.1. Продукт гена A63.1 был получен в рекомбинантном виде и очищен до гомогенности в нативной конформации. Как и соответствующий аналог G7C gpA63.1 тримеризуется, вероятно, образует хвостовые шипы вириона, отвечает за первичное распознавание клеточной поверхности и модифицирует O-антиген. Однако, характер этой модификации другой. gpA63.1 — гликозилгидролаза — деполимеризует O-антиген, обеспечивая продвижение фага к внешней мембране клеток. Изучение хозяйского спектра Alt63 и особенностей его взаимодействия с чувствительными штаммами *E. coli* выявило гетерогенность популяций Alt63. Препараты Alt63, выращенные на мутантном штамме 4S *wclK*-, давали сниженную эффективность посева (10-6) на 4S дикого типа (фенотип Alt634S-). Alt63, полученный на штамме 4S дикого типа, одинаково титровался на обоих штаммах *E. coli* (фенотип Alt634S+). Анализ кинетики адсорбции фагов на живых бактериях выявил существенные аномалии адсорбции вирусов Alt634S-, полученных на мутантном штамме 4S *wclK*-. Кривая адсорбции таких фагов имела выраженный двухфазный характер. Секвенирование гена A63.1 в тридцати препаратах Alt63, независимо полученных на клетках 4S и 4S *wclK*-, выявило строгую корреляцию между наблюдаемым фенотипом фага и присутствием в 500-м положении белка gpA63.1 остатка аргинина и гистидина, соответственно. Была объяснена сниженная эффективность посева Alt634S- на клетках 4S дикого типа. Взаимодействие таких фагов с липополисахаридами клеток дикого типа приводит к преждевременному aberrантному выходу вирусного генома в среду — фаг погибает при контакте с первичными рецепторами на клетках *E. coli* 4S. Однако, спорадические замены 500-го аминокислотного остатка gpA63.1 в популяциях фагов Alt634S+ на остаток гистидина в условиях достаточной плотности клеток 4S *wclK*- в среде приводят к быстрому отбору таких фагов в жидких культурах и вытеснению фагов Alt634S+ с более широким хозяйским спектром.

### **T095 ИНДИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *CITROBACTER* С ПРИМЕНЕНИЕМ ИНДИКАТОРНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ С ПОМОЩЬЮ РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА (РНФ)**

Л.П. Пульчеровская, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Е.О. Ефрейторова

ФГБОУ ВПО УГСХА им. П.А. Столыпина

Целью исследований явилось проведение возможности применения реакции нарастания титра фага при обнаружении бактерий рода *Citrobacter* в патологическом материале и объектах внешней среды с помощью индикаторных бактериофагов. Для этого мы провели исследования по индикации цитробактеров в искусственно контаминированных ими фекальных массах и мясе.

Индикаторные бактериофаги представляли собой специфические вирулентные фаги с широким спектром литического действия на штаммы бактерий рода *Citrobacter*. Фаги не лизируют бактерии гетерологических семейств, родов, видов.

Исследуемые пробы вносили в стерильные колбы, заливали МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 г. В опытные колбы вносили индикаторные культуры бактерий рода *Citrobacter*.

Исследование проводили методом агаровых слоев. Использовали МПА, содержащий 1,5%-0,7% агара. Допустимо вместо 1,5% МПА использовать агар на рыбном гидролизате. Мясопептонный агар разливали в чашки по 25-30 мл.

Для подавления роста воздушной микрофлоры перед разливом добавляли к расплавленному агару 0,04%-ный спиртовой раствор генцианвиолета (0,1 мл на каждые 100 мл МПА). Чашки подсушивали в боксе или термостате в течение 3 часов.

Индикаторные культуры бактерий рода *Citrobacter* выращивали на скошенном МПА в течение 16 часов и смывали физиологическим раствором (в количестве 10 мл).

Для определения количества корпускул фага в опытной пробе и в контроле титра использовали по две чашки, для пробы на свободный фаг — одну чашку. При проведении нескольких анализов ставили один контроль. Через 20-30 минут после застывания верхнего слоя агара чашки помещали в термостат на 16 часов.

Разработанная авторами схема постановки РНФ с фагами бактерий *Citrobacter* является высокоспецифичной и обладает достаточной чувствительностью для обнаружения указанных микроорганизмов при их концентрации от 10 и более м.к. в 1 грамме исследуемого материала. Количество негативных колоний фагов при этом повышается в 7,7 и более раз.

Используя РНФ с фагами полученными авторами, можно провести индикацию бактериальных культур *Citrobacter* в объектах внешней среды, патологическом материале и пищевом сырье без выделения чистой культуры в течение 16-18 часов.

### **T096 ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФАГОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТАФИЛОКОККОВ С АТИПИЧНЫМИ СВОЙСТВАМИ**

О.Е. Пунченко

СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Носители *Staphylococcus aureus* являются основным резервуаром стафилококковой инфекции. Золотистый стафилококк, выделяемый от носителей, может обладать нетипичными свойствами, что затрудняет идентификацию таких штаммов.

**Цель.** Изучить свойства *S. aureus*, выделенных от студентов и с объектов окружающей среды.

**Материалы и методы.** Забор и посев материала проводили согласно действующим нормативным документам. У идентифицированных как *S. aureus* штаммов проверяли чувствительность к Бактериофагу стафилококковому производства ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России. Для фаготипирования *S. aureus* использовали стандартный набор Международных фагов по общепринятой методике.

**Полученные результаты.** Среди выросших на ЖСА подозрительных на золотистый стафилококк (пигмент, наличие лецитовителлазной активности) штаммов от носителей были идентифицированы как *S. aureus* 89,2% штамма; с объектов окружающей среды — 84,2% отнесены к *S. aureus*; на восьми телефонах, что составляет 7,8%, выявлены *S. aureus*; из воздуха из 4 подозрительных штаммов только один (25%) был подтвержден как *S. aureus*. Принадлежность к золотистому стафилококку проверяли в тесте анаэробной ферментации маннита и с помощью хромогенной среды HiCrome MeReSa Agar Base, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Индия. Также как *S. aureus* были идентифицированы колонии следующих типов: белые с лецитовителлазной активностью (4 штамма), непигментированные (21 штамм) и пигментированные (11 штаммов) без лецитовителлазной активности. У 24,5% штаммов стафилококков от носителей, 100% — из воздуха, 4% — с объектов окружающей среды выявлена гемолитическая активность. Протеолитическая активность была характерна для 30,6% штаммов от человека и 50,5% штаммов из объектов окружающей среды. Чувствительными к Бактериофагу стафилококковому оказались все выделенные с предметов штаммы, 66,7% штаммов — от носителей и 75% штаммов — из воздушной среды. Определить фаготип удалось для 53% штаммов *S. aureus* от носителей. Остальные штаммы или были нечувствительны к фагам из Международного набора, или лизировались большим разведением фага, что не может учитываться для определения фаготипа.

**Выводы.** Так как менее 40% выделенных штаммов *S. aureus* обладают типичными морфологическими и культуральными свойствами, постановка тестов фагодифференцировки может быть полезной для ускоренной идентификации стафилококков. Также постановка тестов по определению чувствительности выделенной культуры к лечебным фагам необходима, так как только этот способ позволит выбрать высоко вирулентный фаг для санации.

### **T097 ПРОБИОТИК ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ИНФЕКЦИЙ МОЧЕВЫХ ПУТЕЙ**

И.А. Ратникова, Н.Н. Гаврилова, К. Баякышова, В.Г. Мельников

РГП на ПХВ «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан

**Цель работы** — создание пробиотика на основе молочнокислых и пропионовокислых бактерий для лечения инфекций мочевых путей.

**Материалы и методы.** В результате исследований получен пробиотик на основе ассоциации из молочнокислых бактерий (*Lactobacillus casei*-139, *Lactobacillus fermentum*-127<sub>n</sub>, *Lactobacillus casei*-173a, *Lactobacillus brevis* Б-3) и пропионовокислых бактерий, обладающей высокой антагонистической активностью в от-

ношении *Candida albicans* и клинических штаммов *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*, устойчивой к антибиотикам, применяемым для лечения воспалительных заболеваний. Испытания пробиотика проведены в НЦ урологии на больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ) 1–2 степени, осложненной после катетеризации воспалением нижних мочевых путей, а также при лечении больных хроническим калькулезным пиелонефритом и мочекаменной болезнью, осложненной хроническим пиелонефритом, протекающем на фоне дисбактериозов кишечника.

**Результаты.** Установлено, что эндовизикальное применение эубиотика при «катетерассоциированной» инфекции у больных ДГПЖ позволяет повысить эффективность стандартного антибактериального лечения в 2.5–3.7 раза.

При лечении хронического калькулезного пиелонефрита больные опытной группы принимали перорально эубиотик за 20 минут до еды курсом 10 дней на фоне антибактериальной терапии. В контрольной группе проводилась только антибактериальная терапия с использованием антибиотиков. Спустя 10 дней у 87% больных опытной группы наблюдалась тенденция к санации мочи от инфекции. У 13% больных сохранялся высев *P. aeruginosa* до  $10^4$  микробных клеток/мл, однако у культуры снизилась резистентность к применяемым антибиотикам. В контрольной группе у 65% больных титр высеваемых микроорганизмов сохранился от  $10^4$  до  $10^6$  микробных клеток/мл.

При испытании данной ассоциации на больных мочекаменной болезнью дачу пробиотика проводили пероральным способом семидневными курсами за 15 минут до приема пищи без применения антибиотиков. Полное выздоровление наступало после третьего курса лечения. При этом повышался уровень нормальной симбиотической микрофлоры.

**Выводы.** Пробиотик рекомендован для комплексной терапии инфекций мочевых путей.

#### **T098 ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА (RAPD-АНАЛИЗ) ДНК СОДЕРЖАЩИХ БАКТЕРИОФАГОВ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ**

Л.В. Романова, Б.Н. Мишанькин, Т.А. Кудрякова,  
Т.Н. Бородина, Н.Е. Гаевская, Л.Д. Македонова,  
Г.В. Качкина

ФКУЗ РостНИИПЧИ Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону,  
Россия

К роду *Vibrio* относится более 25 видов микроорганизмов, из которых помимо *V. cholerae* по крайней мере 8 видов способны вызывать заболевания у людей. Особую важность среди них (по частоте и тяжести вызываемых ими заболеваний) представляют штаммы *V. parahaemolyticus* и *V. alginolyticus*. Все эти вибрионы являются обитателями морей и заливов. Заражение происходит либо при купании, либо при употреблении в пищу продуктов морского происхождения. Из лизогенных штаммов парагемолитических вибрионов различного происхождения были выделены бактериофаги различных морфо и серогрупп, ДНК которых исследовали в однопраймерной ПЦР (RAPD-анализ).

В своих исследованиях по молекулярному типированию бактериофагов патогенных парагемолитических вибрионов мы использовали преимущественно однопраймерный вариант ПЦР и набор универсальных праймеров (45, 1, 2, D9A, 21, OPLZ 13, Ar7, pUC/M12 и WO).

В работе исследовали ДНК фагов парагемолитических вибрионов: 7; 155; 616; 1154 (выделены из

лизогенных штаммов, циркулирующих в Черном море – г. Новороссийск), 16763; 17036; 17078 (Азовское море – г. Бердянск) и 17722s; 17748; 19152 (Приморье – г. Владивосток).

Исследования показали, что использованные праймеры оказались способны амплифицировать последовательности хромосомной ДНК исследуемых бактериофагов по разному и образовывать ПЦР-профили в виде фрагментов ДНК количеством от 21 до 1 и размером от 2356 до 100 п.н. Следует отметить, что из изученной коллекции имеют большое сходство ПЦР профили фагов 7, 155, 616 и 1154 (одного происхождения) у остальных фагов картина распределения амплифицированных фрагментов ДНК индивидуальна.

Таким образом, исследования показали, что для дальнейшего изучения ДНК фагов патогенных вибрионов лучше всего подходят праймеры 1, 2, Ar7, M13, OPLZ 13 и pUC/M13. Проведена генотипическая характеристика (паспортизация) каждого из изученных изолятов и выявлены отличия в генетической структуре циркулирующих штаммов, проявляющиеся в различной картине ПЦР ампликонов.

#### **T099 ОСОБЕННОСТИ БИОИНФОРМАЦИОННОГО АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ DE NOVO СЕКВЕНИРОВАНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ НА СЕКВЕНАТОРАХ ВТОРОГО ПОКОЛЕНИЯ**

Е.О. Рубальский<sup>1,2</sup>, А.В. Алешкин<sup>1,2</sup>, С.С. Афанасьев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ООО «БиФаг», Москва, Россия

<sup>2</sup>ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,  
Москва, Россия

С широким распространением секвенаторов второго поколения стало возможным в сравнительно короткие сроки получать большой объем данных секвенирования. Количество прочтений (ридов) участков геномов микроорганизмов, в том числе и бактериофагов, за один запуск секвенатора составляет от нескольких десятков тысяч и более. Такая производительность позволяет порой по результатам одного запуска секвенатора осуществить полноценную сборку генома бактериофага de novo. Однако чаще всего достоверная сборка генома не является тривиальной задачей и требует использования различных методов биоинформатики. Нами осуществлена сборка геномов ряда бактериофагов, в том числе входящих в состав специализированного пищевого продукта диетического (профилактического) питания «ФУДФАГ». Сборка геномов осуществлялась на высокопроизводительных вычислительных системах, работающих под управлением ОС Ubuntu.

В ходе проведенных биоинформационных исследований был выработан типовой программный конвейер (пайплайн) для de novo сборки геномов бактериофагов. Пайплайн включает фильтрацию качества ридов (тримминг), непосредственно de novo сборку контигов, построение скаффолдов, второй раунд de novo сборки. Критериями завершённой сборки генома являлись: отсутствие разрывов в собранной последовательности; глубина покрытия ридами не ниже  $10\times$  при среднем качестве оснований в риде не ниже Q30 (или эквивалент). При недостаточном количестве и/или качестве прочтений было рекомендовано проведение ресеквенирования методом дробовика (shotgun) на секвенаторе второго поколения, а также целевого ресеквенирования по Сэнгеру. Собранные таким образом геномы бактериофагов позволяют определить уникальность бактериофага, выявить наиболее близкородственные известные секвенированные штаммы, провести аннотирование генома.

### **T100 ОТБОР МЕТОДОМ ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ И АНАЛИЗ ПЕПТИДОВ, УЗНАВАЕМЫХ ШИРОКОНЕЙТРАЛИЗУЮЩИМ АНТИТЕЛОМ VRC01**

А.П. Рудометов, Н.В. Волкова, А. Бакулина, Н.С. Щербакова, А.Н. Чикаев, Д.Н. Щербаков, ФБУН ГНЦ ВВ «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

За последние 30 лет более 60 млн человек приобрели статус ВИЧ-инфицированных и 25 миллионов из них погибли. В настоящее время тридцать три миллиона пациентов живут с ВИЧ-1, что делает это заболевание основной глобальной проблемой общественного здравоохранения.

Наиболее радикальным способом решения проблемы могло бы быть создание вакцины против ВИЧ-1. В настоящее время пристальное внимание исследователей направлено на изучение феномена антител, способных нейтрализовать широкий спектр первичных изолятов ВИЧ-1. Считается, что эффективная вакцина против ВИЧ должна индуцировать выработку подобных антител.

Одним из подходов к их изучению является метод фагового дисплея. Суть метода заключается в создании библиотек пептидов на основе нитчатых бактериофагов путем встройки в их геном рандомизованных нуклеотидных последовательностей, кодирующих пептиды, которые экспонируются на поверхности вириона в составе белков оболочки. Число фагов в библиотеке достигает  $10^9$  индивидуальных клонов. Из этого многообразия с помощью аффинной селекции можно отобрать пептиды, специфически взаимодействующие практически с любой мишенью.

В рамках данной работы была проведена аффинная селекция пептидов из библиотеки Ph.D-c7c (New England Biolabs, США) с использованием моноклонального антитела VRC01 нейтрализующего широкий спектр первичных изолятов ВИЧ-1. Были отобраны связавшиеся с VRC01 фаги и определен аминокислотный состав экспонированных на их поверхности пептидов. Специфичность связывания выделенных бактериофагов с VRC01 подтверждали с помощью дот-блот анализа. Были выявлены фаги, связывающиеся с VRC01 с наибольшей аффинностью. Рандомизованные пептиды, экспонируемые этими фагами, были химически синтезированы и использовались в анализе конкурентного ингибирования нейтрализующей активности VRC01 с использованием псевдовирусов ВИЧ-1. Полученные пептиды продемонстрировали способность ингибировать реакцию вирус нейтрализации. Это дает основание полагать, что они способны имитировать структуру «нативного» эпитопа VRC01.

### **T101 РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ VIBRIO ALGINOLYTICUS И VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ СТРАН В РАЗНЫЕ ГОДЫ**

О.А. Рыковская, О.С. Чемисова, Л.М. Смоликова, А.В. Тришина, А.В. Картамышева, Е.М. Санамянц, М.М. Сагакянц

ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт, Ростов-на-Дону, Россия

Парагемолитические и алгинолитические вибрионы способны вызывать у людей гастроэнте-

риты и раневые инфекции, связанные с купанием в морской воде и употреблением в пищу морепродуктов. Широко распространившийся, начиная с 1996 г., высоковирулентный клон *V. parahaemolyticus*, названный «пандемичным», признан основным этиологическим агентом пищевой токсикоинфекции во всем мире. Возникшая в этой связи необходимость соответствующего мониторинга, включает и наблюдение за изменением чувствительности возбудителя к антибактериальным препаратам. Целью настоящего исследования явилась оценка антибиотикограмм парагемолитических и алгинолитических вибрионов, выделенных от людей. Изучено по 50 клинических штаммов *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus*, «предпандемичного» и «пандемичного» вариантов.

Все штаммы охарактеризованы комплексным методом оценки патогенности, включающим определение уреазной, гемолитической активности (Канагава-феномен) и ПЦР-детекцию генов гемолизина: термостабильного прямого (tdh) и TDH-подобного (trh). Антибиотикоустойчивость определена диско-диффузионным методом на среде Мюллера-Хинтона к 13 антибактериальным препаратам разных групп. Индекс множественной резистентности (МАР) рассчитан по формуле  $a/b$ , где  $a$  — число антибиотиков, к которым были устойчивы штаммы и  $b$  — общее число антибиотиков в данном исследовании. Парагемолитические вибрионы были Канагава-позитивны, уреазы-негативны, имели ген *tdh* при отсутствии *trh*. Названные гены не выявлены у алгинолитических вибрионов. У «пандемичного» и «предпандемичного» вариантов *V. parahaemolyticus* установлена чувствительность соответственно к доксициклину (67% и 78%), тетрациклину (92% и 96%), налидиксовой кислоте (98% и 100%), гентамицину (59% и 76%), амикацину (65% и 57%), цефотаксиму (76% и 78%), цефтриаксону (76% и 78%), ко-тримоксазолу (84% и 63%) и левомицетину (90% и 90%).

У этих же групп вибрионов отмечена устойчивость к ампицилину в 94 и 80 % случаев. Возросло в 4–8 раз число «пандемичных штаммов», устойчивых к рифампицину, стрептомицину, фуразолидону. До 67% штаммов оказались устойчивыми одновременно к 2–6 антибиотикам. «Предпандемичные» штаммы были резистентны к ампициллину, стрептомицину, канамицину, фуразолидону, ципрофлоксацину, рифампицину в разных сочетаниях. У полирезистентных «пандемичных» изолятов дополнительно к вышеупомянутым маркерам выявлена устойчивость к доксициклину, налидиксовой кислоте, тетрациклину, гентамицину, ко-тримоксазолу.

О расширении спектра резистентности у вибрионов «пандемичной» группы свидетельствовало увеличение индекса множественной резистентности. У клинических штаммов *V. alginolyticus* подобно штаммам парагемолитических вибрионов отмечена высокая чувствительность к доксициклину (79%), тетрациклину (72%), налидиксовой кислоте (97%), гентамицину (85%), амикацину (58%), ко-тримоксазолу (76%), левомицетину (76%), цефотаксиму (70%), цефтриаксону (64%). Однако, в отличие от *V. parahaemolyticus*, больший процент штаммов *V. alginolyticus* был чувствителен к стрептомицину (61%).

Отмечена резистентность к канамицину, рифампицину, ципрофлоксацину и ампициллину. До 76% штаммов проявили устойчивость одновременно к 2–7 антибиотикам. Полученные данные допол-

няют наши представления о формировании антибиотикорезистентности у микроорганизмов видов *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus*.

### **T102 ХОЛЕСТЕРИНУТИЛИЗИРУЮЩИЕ, АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА СИНБИОТИЧЕСКОГО ПРОДУКТА «НУР»**

С.А. Садуахасова, А.Р. Кушугулова, И.К. Тыныбаева,  
Д. Баисханова, С.С. Кожамбетов, Г.С. Шахабаева,  
Н.М. Бисенова, Б.Д. Бикебаева, Н.В. Калина,  
С.К. Бисембаева, В.М. Абрамов

ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии  
и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Москва, Россия  
ЧУ «Центр наук о жизни», Астана, Казахстан

**Введение.** Среди немедикаментозных методов лечения и профилактики особо важное значение имеет лечебное питание. Пищевые продукты, поступая в организм, преобразуются в процессе метаболизма в структурные элементы клеток, обеспечивают адекватное функциональное состояние всех органов и систем организма, определяют состояние здоровья и продолжительность жизни. М.И. Певзнер писал: «там, где нет лечебного питания, там нет рационального лечения», известно высказывание Гиппократов: «Пусть пища будет твоим лекарством, а лекарство твоей пищей». Целью настоящих исследований является изучение холестеринутилизующего, антиоксидантного эффекта синбиотического продукта НУР.

**Методы.** Исследования проводились *in vitro*. Определение общей антиоксидантной активности, активности супероксиддисмутазы, глутатионредуктазы производилось спектрофотометрически с использованием наборов *Sigma*-Aldrich. Холестеринутилизующее действие образцов анализировалось с помощью ферментативного колориметрического (570 нм) теста Cholesterol Quantitation Kit, Sigma.

**Результаты.** Наши исследования показали высокий уровень общей антиоксидантной активности синбиотического продукта (67,4 мМ/мл). Одним из механизмов инактивации радикалов антиоксидативного стресса бактериями является экспрессия СОД. Анализ работы выявил супероксиддисмутазную активность синбиотика (1,42 ед/мг белка). Глутатионредуктазная активность синбиотического продукта оказалась высокой, и составила 0,0631ед/мл.

Результаты показали способность пробиотического консорциума, на основе которого создан синбиотик, ассимилировать холестерин при росте в бульонной среде МРС-1 до 22%, а в присутствии 0,2% бычьей желчи достигает 50%.

Таким образом, новый синбиотик «НУР», исследованный в условиях *in vitro*, обладает высокой антиоксидантной и холестеринутилизующей активностью и может оказывать положительное протекторное действие при лечении и профилактике многих современных болезней человека.

### **T103 ПРИМЕНЕНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО ПАРОДОНТИТА**

Л.А. Сайгушева, А.В. Куяров, А.Ю. Миронов, Е.Ф. Дудко  
ГБОУ ВПО «Сургутский государственный университет Ханты-  
Мансийского автономного округа - Югры», Сургут, Россия

В развитии воспалительных заболеваний пародонта ведущую роль отводят микробным и иммун-

ным механизмам, а прогноз и течение заболеваний зависят от уровня неспецифической резистентности как тканей, вовлеченных в патологический процесс, так и всего организма.

В связи с этим целью нашего исследования явилось изучение динамики показателей папиллярно-маргинально-альвеолярного индекса – РМА (в модификации Parma, 1960) и микрофлоры кишечника у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом на фоне использования пробиотической смеси в комплексном лечении.

Под наблюдением находилось 63 человека в возрасте от 29 до 47 лет (мужчин – 27, женщин – 36) с диагнозом хронического генерализованного пародонтита средней степени тяжести. Всем пациентам было проведено клиничко-бактериологическое обследование до лечения, через 14 и 30 дней.

В группе сравнения (31 человек) после проведения профессиональной гигиены использовали стандартную терапию хронического пародонтита, курс лечения 14 дней. У пациентов основной группы (32 человека) в комплекс лечебных мероприятий входил прием пробиотической смеси внутрь и в виде ротовых ванночек. После курса лечения пациенты продолжали принимать пробиотическую смесь в течение месяца.

После проведенного лечения в основной группе выявлено достоверное уменьшение индекса РМА с  $32,2 \pm 0,4$  до  $4,3 \pm 0,1$  в то время как в группе сравнения наблюдалось снижение показателя с  $30,8 \pm 0,4$  до  $9,6 \pm 0,2$ .

При оценке анализов на дисбактериоз у 78,1% пациентов основной группы отмечена тенденция к восстановлению лактобактерий, бифидобактерий и типичной кишечной палочки. У 31,2% количество условнопатогенных микроорганизмов уменьшилось на 1-2 порядка.

Таким образом, использование пробиотиков в комплексном лечении хронического пародонтита позволило улучшить не только пародонтологический статус, но и добиться коррекции микробиоценоза кишечника даже в минимальные сроки, что делает лечение более эффективным. А положительная тенденция нормализации микрофлоры свидетельствует о возможной необходимости продления приема пробиотической смеси до нескольких месяцев.

### **T104 АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ РОДА *STAPHYLOCOCCUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ**

Д.Г. Сверкалова, Д.А. Васильев

ФГБОУ ВПО УГСХА им. П.А. Столыпина

В ходе клиничко-исследовательских работ с мелкими домашними животными, наряду с выделением ассоциаций бактериальных культур, было отмечено получение на плотных питательных средах разряженного роста суточных патологических культур и четких негативных колоний. Чаще всего, наблюдалось выделение бактерий рода *Staphylococcus*.

Целью работы было выявление наличия или отсутствия бактериофагов в пробах, отобранных с патологических очагов поражений мелких домашних животных.

Для решения поставленной задачи каждая отобранная проба суточных ассоциативных культур была подвергнута фильтрованию с использованием бактериологических фильтров. Ассоциация бак-

териальных культур разделялась на отдельные чистые культуры, которые потом использовались для проверки на чувствительность к фильтрату, возможно содержащему бактериофаги, специфичные к исследуемым культурам. Первоначально, наличие бактериофага устанавливали методом «стекающей капли», когда на поверхности суточной агаровой культуры наносили каплю фильтрата и давали ей свободно стечь по среде. Культивировали посеvy 5 суток. В первые сутки посеvy просматривали каждые 6 часов, в последующие — каждые 24 часа. Такое длительное время ведения культуры связано с замедленным проявлением зон лизиса. Частый просмотр в первые сутки продиктован возможностью быстрого формирования вторичного роста, который затрудняет в последующем учет наличия зон лизиса. При образовании по месту нанесения фильтрата «стерильных зон» или зон с различной интенсивностью роста культур на бактериальном газоне, с характерных участков отбирался материал в мясопептонный бульон с добавлением чистой чувствительной культуры. Проводился повторный пассаж. Вторичное получение зон лизиса, считалось подтверждением наличия бактериофага в фильтрате. Определялся род выделенных культур, проводился количественный подсчет.

В результате проведенной работы, были получены данные, характеризующие процентное соотношение выделения культур бактерий рода *Staphylococcus* и их бактериофагов из очагов патологических поражений мелких домашних животных.

#### **T105 ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИКОВ НА ЭКСПРЕССИЮ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НЕ O1/ НЕ O139 СЕРОГРУПП В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

**Н.А. Селянская, О.Д. Кирилова, Л.М. Веркина**  
ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт  
Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Устойчивость к антибиотикам возбудителя холеры характеризуется различным набором маркеров резистентности, нестабильностью их проявления и зависимостью от экспрессии генов антибиотикорезистентности (И.В. Рыжко и др., 2007). Вызывает интерес зависимость экспрессии антибиотикорезистентности от контакта с антибактериальным препаратом у *Vibrio cholerae* non O1/ non O139.

**Цель исследования:** изучение экспрессии антибиотикоустойчивости у *V. cholerae* non O1/ non O139 в зависимости от контакта с антибактериальным препаратом.

**Материалы и методы.** В работе использовали 20 клинических изолятов *V. cholerae* non O1/ non O139 (ctx<sup>+</sup> и ctx<sup>-</sup>), контрольный антибиотикочувствительный штамм *V. cholerae* El Tor P-5879 (ctx<sup>+</sup>). Чувствительность/устойчивость штаммов к антибиотикам определяли методом серийных разведений в плотной питательной среде в соответствии с МУК 4.2.2495-09 (2009г.). Экспрессию антибиотикоустойчивости изучали путем определения значений МПК до и после контакта с ампициллином (А), тетрациклином (Т), левомицетином (Л).

**Результаты.** Фенотипы антибиотикорезистентности штаммов до контакта с антибиотиками характеризовались устойчивостью к триметоприму/сульфаметоксазолу, стрептомицину, канамицину, рифампицину, фуразолидону, А в разных сочетаниях и чувствительностью к Т и Л. При пересеве на антибиотиках (8–10

пересевов) у всех штаммов, кроме контрольного, повышалась устойчивость не только к этим препаратам, но и дополнительно: к А, Л, С (при пересевах на Т); А (при пересевах на Л); Т (при пересевах на А).

**Заключение.** При воздействии Т, Л, А в штаммах *V. cholerae* non O1/ non O139 могут экспрессироваться дополнительные маркеры антибиотикорезистентности, что может быть одной из причин расширения спектра антибиотикоустойчивости во время вспышки инфекции. Это вызывает необходимость постоянного изучения антибиотикограмм выделенных от больных культур со своевременной заменой неэффективного препарата на эффективный.

#### **T106 ПРИМЕНЕНИЕ ФАГОТЕРАПИИ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ТКАНЕЙ ПОЛОСТИ РТА, ОКРУЖАЮЩИХ ДЕНТАЛЬНЫЕ ИМПЛАНТЫ**

**А.В. Силин, Н.Е. Абрамова, Е.В. Леонова, Е.О. Бондаренко**

ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Число пациентов имеющих в полости рта ортопедические конструкции на дентальных имплантатах возросло, возросло и количество мукозитов и перимплантитов возникающих под воздействием микроорганизмов полости рта (пародонтопатогенов).

Цель нашей работы - оценка антибактериальной эффективности фаготерапии препаратом «Фагодент» (ООО «МикроМир») для профилактики возникновения воспалительных изменений в тканях окружающих дентальные имплантаты.

Под наблюдением находилось 24 пациента с хронический генерализованный пародонтит средней степени тяжести, которым было проведено протезирование на 32 дентальных имплантатах. Оценка клинических параметров и ПЦР-исследование на наличие пародонтопатогенов проводили после завершения ортопедического этапа комплексного лечения в течение первой недели и через 6, 12 месяцев. Уже в первую неделю функционирования ортопедических конструкций у 31% имплантатов были выявлены пародонтопатогены при клинически здоровой десне.

По результатам первичного ПЦР-исследования 10 имплантатов имеющих в содержимом десневой борозды пародонтопатогены составили группу 1, не имеющих — группы 2 (15 имплантатов) и контроля (7 имплантатов).

Всем пациентам рекомендовали традиционный уход за полостью рта и явку через 6 месяцев на поддерживающую терапию. В группах 1 и 2 — дополнительно раз в месяц в течение недели наносить на десневой гель «Фагодент» два раза в сутки.

ПЦР исследование содержимого десневой борозды проведенное через 6 месяцев показало: в группе 1 — у 3-х имплантатов выявлены пародонтопатогены, а клиника мукозита диагностирована у 1-го; в группе 2 — у 2-х с клинической картиной мукозита. Через год функционирования имплантатов с постоянными ортопедическими конструкциями клинически наблюдалось отсутствие пародонтопатогенов и признаков воспаления вокруг имплантатов в группах 1 и 2, тогда как у всех пациентов контрольной группы (7 имплантатов) — диагностированы наличие пародонтопатогенов по результатам ПЦР и признаки воспаления.

Применение препарата содержащего бактериофаги позволило провести стойкую деконтаминацию десневой борозды, как при диагностированном мукозите, так и осуществить профилактику его возникновения.

### **T107 ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОТЕРАПИИ В СОСТАВЕ КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ПАРОДОНТИТОМ СРЕДНЕЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ**

**А.В. Силин, Н.Е. Абрамова, Е.В. Леонова, В.А. Гордеева,  
С.В. Кононова**

*ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург,  
Россия*

Антибактериальные препараты – важный компонент комплексной терапии воспалительных заболеваний пародонта, однако после их применения возможны побочные эффекты: возникновение резистентной микрофлоры и дисбактериоза, системное действие, аллергические реакции и др. Альтернативой им может быть бактериофаготерапия.

Цель работы: оценить антибактериальную эффективность препарата «Фагодент» ООО «Микромир» у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести. Под наблюдением находилось 38 пациентов в возрасте 35–60 лет. Клиническое состояние тканей пародонта оценивали с помощью индексов: ПМА, кровоточивости, гигиены по Федорову – Володкиной. Глубину ПК измеряли по самой глубокой точке с помощью градуированного зонда. Больные были распределены на 2 группы: в основной группе для купирования воспаления в течении 14 дней применяли гель «Фагодент», в контрольной – гель «Метрогил-дента». Эффективность лечения оценивали через две недели по динамике индексов и содержанию микроорганизмов в зубодесневом кармане методом ПЦР реал-тайм.

После лечения выявлена положительная динамика пародонтальных индексов и снижение частоты обнаружения основных пародонтопатогенов: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas endodontalis*. В основной группе частота встречаемости 4-х наиболее агрессивных пародонтопатогенов снизилась в 4 раза, всех шести в 2 раза. В 23% случаев не было выявлено ни одного из исследуемых микроорганизмов. В контрольной группе снижение частоты встречаемости четырех пародонтопатогенов произошло в 3,8 раза; шести в 1,5 раза.

Вывод: препарат «Фагодент» эффективен при лечении ВЗП и может быть рекомендован для применения на всех этапах комплексного пародонтологического лечения.

### **T108 ВОЗМОЖНОСТЬ УПРАВЛЕНИЯ ИНФЕКЦИЕЙ**

**И.Г. Ситников, А.А. Шошин, А.Р. Болхов**

*ГБОУ ВПО ЯГМА, Ярославль, Россия*

В настоящее время использование антибиотиков, нередко бесконтрольное и необоснованное, привело к формированию множественной лекарственной резистентности бактериальных штаммов, что существенно затрудняет лечение больных с инфекционной патологией. Экономический ущерб при этом составляет сотни миллионов рублей. В качестве аль-

тернативных лекарственных средств могут применяться бактериофаги – биологические антисептики прямого противобактериального действия, открытые почти столетие назад и незаслуженно забытые. Подобная «забывчивость» была связана с отсутствием в середине 20 века контроля качества препаратов, что приводило к использованию бактериофагов в случайных концентрациях и часто с неизвестным составом. Этому способствовала не только малая изученность и эмпирические способы фаготерапии, но и неизвестные в то время особенности взаимодействия бактериофага с микробной клеткой. Между тем в РФ на протяжении более четырех десятилетий выпускают бактериофаги для лечения и профилактики дизентерии, брюшного тифа, сальмонеллезов, а также против ряда возбудителей гнойно-воспалительных инфекций. Для подавления антибиотикостойчивых форм условно-патогенных бактерий рекомендованы комплексные бактериофаги с высокой литической активностью, способные элиминировать возбудителей гнойно-воспалительных процессов различной локализации. Являясь высоковирулентными и высокоспецифичными вирусами, влияющими на жизненный цикл патогенов с разрушением ДНК, бактериофаги могут быть использованы во многих областях медицины, у больных любого возраста, включая новорожденных и недоношенных детей. Диапазон способов применения бактериофагов необычайно широк и включает не только аппликации на месте поражения, но и пероральный, интравагинальный, подкожный, внутримышечный, внутрибрюшинный способы введения, а также в виде клизм, аэрозолей, введение в полости. Клиническая практика показала, что бактериофаги имеют ряд неоспоримых преимуществ перед антибиотиками: они не подавляют нормальную флору и не нарушают биоценоз организма; не имеют противопоказаний; могут быть использованы как для лечения, в том числе в комбинации с антибиотиками, так и для профилактики бактериальных инфекций; не вызывают развития резистентности, не обладают токсическим и аллергическим эффектами; стимулируют иммунную систему.

### **T109 ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОМНОГО ПОЛИМОРФИЗМА КАЗАХСТАНСКИХ ИЗОЛЯТОВ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS КАК ОСНОВА ДЛЯ СИСТЕМЫ МОЛЕКУЛЯРНО- ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА**

**Ю.А. Скиба<sup>1</sup>, И.В. Мокроусов<sup>2</sup>, Г.А. Исмагулова<sup>1</sup>,  
Э.Р. Мальцева<sup>1</sup>, Р.Е. Жидкеева<sup>1</sup>, А. Бисенбай<sup>1</sup>,  
В.Л. Бисмилда<sup>3</sup>, Л.Т. Чингисова<sup>3</sup>, Г.С. Бекембаева<sup>3</sup>,  
Т.Ш. Абилдаев<sup>3</sup>, Н.А. Айтхожина<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт молекулярной биологии и биохимии им.  
М.А. Айтхожина, Алматы, Казахстан*

<sup>2</sup>*НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера,  
Санкт-Петербург, Россия*

<sup>3</sup>*Национальный центр проблем туберкулеза, Алматы,  
Казахстан*

**Введение.** Несмотря на некоторое улучшение эпидемиологической ситуации за последние годы, Республика Казахстан, по данным ВОЗ, остается в списке стран с высоким уровнем заболеваемости населения туберкулезом. Отсутствие в Казахстане реально действующей системы эпидемиологического мониторинга и единой базы данных генотипов осложняет слежение за распространением наиболее опасных кло-



нальных вариантов *M. tuberculosis*, ассоциированных с множественной и широкой лекарственной устойчивостью.

**Материалы и методы.** Объектом исследования являлись клинические изоляты *M. tuberculosis* ( $n = 1500$ ) из различных регионов Республики Казахстан. Образцы охарактеризованы по устойчивости к препаратам 1-го и 2-го рядов с использованием стандартного метода культивирования на среде Левенштейна-Йенсена и системы BACTEC MGIT 960. Генотипирование выборки изолятов ( $n = 576$ ) осуществляли с помощью методов 24-MIRU-VNTR (Supply et al, 2006) и сполитипирования (Kamerbeek et al., 1994) с последующим сравнением с базами MIRU-VNTRplus и SITVIT\_WEB.

**Результаты.** По результатам MIRU-VNTR типирования выявлены семейства *Beijing* – 458 изолятов, LAM – 38, URAL – 20, NEW-1 – 6, Haarlem – 6, Delhi/CAS – 2; не установлено – 11. Субтип *Beijing* 442333564425538 выявлен для 212 образцов. 35 изолятов образовали отдельную ветвь и не имели строгих совпадений с референтными типами MIRU-VNTRplus и отнесены к отдельной группе ранее названной нами KAZ-1.

Также установлено, что штаммы семейства *Beijing* ассоциированы с множественной лекарственной устойчивостью ( $p < 0,00001$ ).

В 2012 г. было начато создание электронной базы данных клинко-эпидемиологической и молекулярно-генетической информации на основе программного обеспечения Oracle. База данных разрабатывается как инструмент и основа для системы молекулярно-эпидемиологического мониторинга циркулирующих на территории Казахстана штаммов *M. tuberculosis*.

**Заключение.** В результате исследования структуры Казахстанской популяции *M. tuberculosis* установлено явное преобладание генетического семейства *Beijing* среди лекарственно-резистентных штаммов, выделенных от больных в ряде географических регионов. Кроме того, для изолятов этого генотипа показан высокий уровень кластеризации и вероятности наличия множественной и широкой лекарственной устойчивости. На основании этого можно заключить, что штаммы семейства *Beijing* представляет особую эпидемическую опасность для Казахстана.

#### **T110 ВЛИЯНИЕ ПРИЁМА ПРОБИОТИКА НА ОСНОВЕ LACTOBACILLUS SPP. НА ДИНАМИКУ И СПЕКТР КОЛИФАГОВ КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ ПОРОСЯТ**

Н.Э. Скобликов<sup>1</sup>, А.А. Зимин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Северо-Кавказский научно-исследовательский институт животноводства (СКНИИЖ), г. Краснодар, Россия

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина (ИБФМ), г. Пущино, Московская обл., Россия

Проведено исследование влияния приёма пробиотика на основе *Lactobacillus paracasei* на динамику и спектр колифагов, выделяемых из кишечной микрофлоры поросят в возрасте 3 – 9 недель.

Отобраны трое поросят, получавших пробиотик с концентрацией лактобактерий  $10^{10}$  КОЕ/мл. Разовая доза составляла  $2,0 \cdot 10^{11}$  КОЕ на голову в сутки.

У животных отбирались образцы фекалий на 17-й, 21-й, 24-й, 27-й, 31-й, 35-й, 39-й, 42-й, 46-й, 53-й и 59-й день жизни (всего 11 раз, т.е., 33 образца); после чего взвешивали, и ресуспендировали в фаговом буфере. Из суспензии делали 100-кратные разведения,

из которых производили высеив на культуры лабораторного штамма *E. coli* B методом агаровых слоёв. Учитывали титр фагов и отбирали бляшки для дальнейшего исследования, учитывая их морфологические особенности.

Молекулярно-генетическую характеристику фагов проводили методом ПЦР с праймерами, позволяющими выявить значимые для фагов T4-типа семейства *Myoviridae* маркеры: ген 23 (праймеры *MZia1* и *Cap8*), ген 32 (*FR60* и *FR61*) и ген *hoc* (*hocIfR* и *hocCrH*).

В результате исследования было выделено 57 колифагов (от 1 до 4 фагов от одного образца), отличающихся друг от друга морфологическими особенностями бляшек. Наибольшим разнообразием типов колифагов отличался период 24 дней, после чего разнообразие снижалось.

Количество колифагов, выделенных от одного животного в течение всех 11 периодов колебалось от 18 до 20. У всех животных график динамики титра колифагов имел общие элементы: исходный (в 17–24 день) титр в пределах  $3,48\text{--}5,78 \lg$  БОЕ/г; резкое снижение (в 27–31 день) до  $1,85\text{--}2,72 \lg$  БОЕ/г; последующее постепенное снижение (в 46 – 59 дней) до неопределяемых значений.

По результатам ПЦР-анализа выяснилось, что большая часть (46 из 57, то есть 80,7%) колифагов имела маркеры принадлежности к фагам T4-типа. Так, из всех 57 фагов 38 фагов (66,7%) были положительны по обоим генам (ген 23 и ген 32), 8 фагов (14,0%) – по гену 23; отрицательными по обоим генам было 11 фагов (19,3%). Ни один из фагов не характеризовался генотипом «g23–g32+».

#### **T111 ШТАММЫ MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. HOMINISSUIS, ВЫДЕЛЕННЫЕ ОТ ЧЕЛОВЕКА: ГЕНОМНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ**

Д.А. Старкова<sup>1</sup>, А.А. Вязовая<sup>1</sup>, И.В. Мокроусов<sup>1</sup>, Т.Ф. Оттен<sup>2</sup>, О.В. Нарвская<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>ФГУ СПбНИИФ, Санкт-Петербург

Нетуберкулезные микобактерии вида *Mycobacterium avium* – типичные обитатели окружающей среды. *M. avium* subsp. *hominissuis* (MAN) способны вызывать микобактериоз у человека. Отмечается рост числа случаев микобактериоза легких у иммунокомпетентных лиц и ВИЧ-инфицированных (Оттен Т. Ф., 2005).

Целью исследования явилась генотипическая характеристика штаммов *M. avium*, выделенных от человека, с использованием комплекса молекулярных маркеров.

Изучены 90 штаммов *M. avium*, выделенных в 2008–2011 г.г. от жителей Санкт-Петербурга и Ленинградской области. Геномный полиморфизм штаммов MAN оценивали по оптимизированной схеме MATR-VNTR-типирования, включающей 14 переменных локусов TR292, X3, 25, 47, 10, MATR-1, -4, -5, -6, -8, -11, -14, -15, -16. (Thibault et al., 2007; Inagaki T., 2009). Прямое секвенирование (по Сенгеру) амплифицированных фрагментов локусов TR10 и MATR-16 осуществляли с использованием анализатора “ABI Prism” 3130. Генотипирование штаммов MAN проводили методом IS1245-RFLP-типирования (D.van Soolingen, 1998; C.Guerrero, 1995). Полученные профили IS1245-RFLP анализировали с использованием пакета программ BioNumerics 5.1.

В результате типирования по 14 локусам MATR-VNTR у 90 штаммов *МАН* было выявлено 36 вариантов профилей. Индивидуальные профили имели 28 (31,1%) штаммов; 62 (68,9%) штамма были представлены кластерами Ma<sub>14</sub>1- Ma<sub>14</sub>8. Наиболее крупный кластер Ma<sub>14</sub>6 включал 37 (41,1%) штаммов с числовым профилем 2222223145443; кластеры Ma<sub>14</sub>2 (2422213145443) и Ma<sub>14</sub>8 (25332'423124222) включали по семь (7,7%) штаммов соответственно, остальные содержали 2-3 штамма.

Штаммы кластера Ma<sub>14</sub>8 имели «усеченный» локус TR10 за счет внутренней делеции 15 п.н. (аллель 2') (GenBank accession no. JQ918769.1). 72 штамма в локусе MATR-16 имели делецию 28 п.н. (аллель 3) (GenBank accession no. KF479191).

В результате IS1245-RFLP-типирования выявлен 51 тип профилей. Из них 47 профилей были индивидуальными, а остальные представлены кластерами Mav1-Mav4, в состав которых входили от двух до трех штаммов с идентичными профилями IS1245.

Полученные данные согласуются с общепринятым мнением о роли объектов окружающей среды в качестве источника инфицирования (в том числе внутрибольничного) человека *МАН*.

## **T112 ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИОФАГА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САЛЬМОНЕЛЛЕЗА ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ**

Д.Н. Степанов<sup>1</sup>, В.И. Плешакова<sup>1</sup>, В.Г. Пугачев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО ОмГАУ им. П. А. Столыпина, Омск, Россия

<sup>2</sup>ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирск, Россия

**Введение.** Экономический ущерб при сальмонеллезе кур складывается в основном из потерь от отхода цыплят раннего возраста, отставания в росте и развитии молодняка кур. Существующие способы лечения сальмонеллеза птиц предусматривают проведение общих ветеринарно-санитарных мероприятий и ориентированы на широкое применение антимикробных препаратов. Известные способы малоэффективны, так как у сальмонелл отмечается широкий спектр антибиотикоустойчивости, а требования к экологическому качеству продукции птицеводства накладывают ограничения на применение антибиотиков.

**Цель исследования.** Изучить терапевтическое действие сальмонеллезного бактериофага на цыплятах-бройлерах при лабораторном заражении культурой *Salmonella enteritidis*.

**Материалы и методы исследования.** Объектом исследования служили цыплята-бройлеры, кросса Ross 308 в количестве 30 голов. Две опытных группы по 10 голов в каждой и контрольная с тем же количеством птицы (n = 10). Из проб сточных вод неблагополучного по сальмонеллезу птицеводства на базе Омской областной ветеринарной лаборатории была изолирована культура *Salmonella enteritidis*. Специфичные к ней фаги выделены на базе ФБУ науки ГНЦ ВБ «Вектор» (г. Новосибирск), где был приготовлен лизат бактериофага фильтрованный через фильтр 0,22 мк с концентрацией фага 10<sup>9</sup>PFU/мл. Заражение птицы проводили в 10 сут. возрасте, суточной бульонной культурой *Salmonella enteritidis*, перорально, однократно, в дозе 1 млрд. микробных клеток. Цыплята-бройлеры были завезены из одного хозяйства в возрасте 3 суток и содержались в виварии. До начала эксперимента вся птица была клинически здорова. Бактериологические исследо-

вания клоакальных смывов на наличие *S. enteritidis* отрицательны.

**Результаты исследований.** В возрасте 10 суток цыплята двух опытных групп, по 10 гол. В каждой, были заражены культурой *S. enteritidis*. При клиническом осмотре на вторые сутки после заражения у птиц отмечали вялость, снижение аппетита, жажду, расстройство пищеварения в виде диареи. По результатам бактериологических исследований клоакальных смывов на 3е сутки после заражения в первой опытной группе была выделена культура *S. enteritidis* у 60% цыплят, во второй у 50%. Цыплят первой опытной группы лечению не подвергали. Цыплятам второй группы (опыт) выпаивали с четвертых суток после заражения по 1,0 мл лизата фага на голову, перорально. Лечебная доза бактериофага составила 10<sup>9</sup>PFU/г. В течение первых трех суток фаг выпаивали каждые 12 часов, с четвертых суток каждые 48 часов по 1 мл/гол. На 7 день после заражения в первой опытной группе (без применения бактериофага) состояние цыплят осталось неизменным (вялость, диарея). В группе с применением фага у цыплят наблюдали повышение активности и аппетита, у двух сохранилось расстройство пищеварения в виде диареи. По результатам бактериологических исследований клоакальных смывов культуру *S. enteritidis* выделяли в первой опытной группе у 90%, во второй у 20% птиц. На 11 сутки после заражения летальность в первой опытной группе составила 40%. При бактериологическом исследовании пат. материала от погибшей птицы была изолирована культура *S. enteritidis*. У оставшейся птицы отмечали отставание в росте и развитии, по результатам бактериологических исследований – бактерионосительство *S. enteritidis*. Во второй группе на фоне применения бактериофага сохранность составила 100%. У всех птиц отмечали хороший аппетит, повышенную активность. Результаты бактериологических исследований клоакальных смывов на *S. enteritidis* отрицательные. За все время эксперимента было выделено 39 изолятов микроорганизмов. Из них в первой опытной группе *S. enteritidis* – 43,5%, *E. Coli* – 12,8%, *Pr. Vulgaris* – 7,7%, *Citr. Freundi* – 5,1%, во второй группе 18%, 7,7%, 2,6%, 2,6% соответственно. Таким образом, использование сальмонеллезных бактериофагов в птицеводстве является перспективным направлением.

## **T113 ОЦЕНКА КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ**

М.А. Суворова

ООО НИЛ «Диагностика», Санкт-Петербург, Россия

Исследование видового состава микробиоты кишечника с применением молекулярно-генетических методов в последние годы становится все более популярным у зарубежных и отечественных исследователей. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени позволяет охарактеризовать качественный и количественный состав нормальной микробиоты, выявить наличие патогенной флоры, то есть выполнить исследования, обычно проводимые в рамках бактериологического анализа. Наши собственные исследования показали высокую степень сопоставимости результатов,

получаемых с применением метода ПЦР и классического бактериологического анализа. Специфичность анализа достигается благодаря использованию олигонуклеотидов и флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов Taqman, подобранных таким образом, чтобы их последовательности соответствовали высококонсервативным участкам бактериального генома. Перспективность такого подхода определяется рядом преимуществ, которыми обладает молекулярно-генетический анализ по сравнению с бактериологическим. Одно из существенных – быстрота выполнения. Немаловажным для клинической лабораторной диагностики является и то, что качественное выполнение исследования методом ПЦР возможно при предъявлении менее жестких требований к транспортировке материала до лаборатории. Кроме того, применение метода ПЦР позволяет расширить спектр выявляемых микроорганизмов, в частности, метод значительно более эффективен, чем бактериологический анализ в определении таких представителей анаэробной флоры, как *Clostridium difficile* и *Fecalibacterium prauznitzii*. На основе данных о количественном составе отдельных представителей микробиоты могут быть рассчитаны отношения, позволяющие выявить различные варианты дисбиотических нарушений. Наиболее часто выявляются снижение количества лактобацилл и бифидобактерий, изолированное, либо сопровождаемое повышением численности бактериоидов. Информативным, по данным литературы и нашим собственным наблюдениям, является также изменение отношения *Bacteroides fragilis*/*Fecalibacterium prauznitzii* и *Escherichia coli*/*Fecalibacterium prauznitzii*, повышение которых отмечено у пациентов с язвенным колитом и другими воспалительными процессами в желудочно-кишечном тракте.

#### **T114 РАЗРАБОТКА ФИЛЬТРАЦИОННОЙ МОДУЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ**

**Н.А. Сырова, Г.И. Коровкина, О.С. Зинина,  
Г.Г. Красичков, Т.В. Аленкина**  
ФКУЗ РосНИИПЧИ «Микроб», Саратов, РФ

Культивирование бактериофагов, применение которых предусмотрено схемой лабораторной диагностики особо опасных инфекций, осуществляется на штаммах-продуцентах II-III групп патогенности, поэтому готовые препараты должны быть специфически стерильны. Применяемые ранее в производстве чумных, холерных и псевдотуберкулезных бактериофагов керамические фильтры устарели и не производятся.

Необходимость совершенствования технологических этапов производства диагностических бактериофагов определило цель работы – на основе анализа современных систем фильтрации экспериментально обосновать выбор наиболее пригодной к внедрению.

Разрабатываемая фильтрационная система (ФС) должна отвечать требованиям биологической безопасности – работа по замкнутой цепи, герметичность, одноэтапность, иметь оптимальные габариты для выполнения работы в боксе безопасности. Каждый модуль системы должен легко монтироваться/демонтироваться для стерилизации и обеззараживания.

В результате была выбрана фильтрационная установка АСФ-011 (Владисарт), в которую помещали 2 ацетатцеллюлозных фильтра (ФМАЦ) 0,2

мкм с минимальной адсорбцией протеинов, обеспечивающих жизнеспособность фаговых частиц, и 1 целлюлозный предфильтр 0,45 мкм. Система оснащена 2 емкостями с монтажами и насосом WP 220 50 Millipore. Каждый модуль ФС собирается и стерилизуется отдельно и может быть заменен без нарушения работоспособности всей системы.

Испытания разработанной ФС на модельных растворах с различной степенью вязкости позволили определить оптимальные величины вакуума, скорость фильтрации, производительность ФМАЦ, доказать герметичность каждого модуля и стерильность конечного продукта.

ФС применили для репродукции маточных холерных фагов. Фильтровали фаголизаты бульонных культур штаммов-продуцентов *V. cholerae*. Эффективность фильтрации определяли постановкой контролей на общую и специфическую стерильность. Данный вид фильтрации обеспечивал получение стерильного продукта с сохранением всех спецификационных показателей качества готового препарата.

Отсутствие отрицательного воздействия ФМАЦ определяли при фильтрации фагов известной концентрации. После фильтрации количество жизнеспособных частиц оставалось на прежнем уровне.

Таким образом, разработанная фильтрационная система обеспечивает завершение биологической схемы производства бактериофагов и позволяет получить стерильный препарат с сохранением всех свойств согласно НД.

#### **T115 ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИОФАГОВ НА РЕЗИДЕНТНЫЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПОПУЛЯЦИИ В КИШЕЧНИКЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

**О.Н. Таланкина<sup>1</sup>, А.К. Голомидова<sup>2</sup>, А.В. Летаров<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского» РАН

В настоящее время остаются мало изученными особенности поведения фагов в микробных сообществах естественных биоценозов организма млекопитающих и человека, в частности, в биотопе толстого кишечника. Как эффективность проникновения фагов в нижние отделы кишечника, так и их способность размножаться и воздействовать на численность соответствующих популяций нуждается в экспериментальном изучении.

**Цель работы:** исследование воздействия экзогенно вводимых фагов на резидентные бактериальные популяции в кишечнике млекопитающих.

**Материалы и методы.** Эксперимент проводили на лабораторных крысах, отобранных в качестве наиболее пригодной модели, т.к. их кишечник обильно заселен *E. coli*. В данном эксперименте использовали 18 животных, трём экспериментальным группам по 4-5 животных в каждой, вводили перорально различные типы фагов, последняя группа (4 животных) служила контролем. У каждой крысы было проведено исследование состава микрофлоры кишечника и оценка разнообразия штаммов *E. coli* методом ПЦР-фингерпринга с использованием праймеров IS1tr. На изолятах от каждой крысы, обладающих наиболее часто встречающимся IS-профилем, были протестированы бактериофаги из внешней среды и колифаг, выделенный из лечебного препарата бактериофага производства ФГУП «Микроген». В результате нами

были отобраны три бактериофага, активных относительно большинства резидентных штаммов *E. coli* у каждой из сформированных групп животных. Лизаты данных фагов были даны крысам *per os* в течение первых суток в виде водного раствора с титром фага  $10^{11}$  КОЕ/мл. Далее мы через определенные промежутки времени отбирали образцы фекалий животных и проводили анализ титра фагов и *E. coli*.

**Результаты и обсуждение.** Титры *E. coli* в фекалиях крыс колебались с течением времени, в среднем составляя  $10^7$  КОЕ/мл, что примерно составляло такое же количество как и до начала эксперимента и какой-либо связи с титром бактериофагов в фекалиях обнаружить не удалось. Обращает на себя внимание, что выход фага значительно меньше его потребления, что говорит об инактивации вируса в ЖКТ. Инактивацию можно объяснить одной из двух причин: действие ферментов желудка и кишечника либо взаимодействие с клетками бактерий, которые не способны поддерживать размножение фага в данных условиях. Нами также не было выявлено достоверной селекции резистентных штаммов. Доля устойчивых изолятов несколько повышалась после обработки фагами, однако в эти дни и в контрольной группе наблюдалось изменение штаммового состава *E. coli*. Все использованные в этом эксперименте фаги в ограниченной степени способны к размножению на резидентных популяциях *E. coli* и их существование в кишечнике крыс было транзитным.

**Выводы.** Можно заключить, что бактериофаги различных групп, активные в отношении резидентных популяций *E. coli* крыс *in vitro* не оказывают выраженного бактерицидного действия *in vivo* даже при применении в очень высоких дозах (около  $10^{12}$  частиц на крысу). Это свидетельствует о том, что резидентные популяции *E. coli* физически защищены от контакта с фагом либо находятся в физиологическом состоянии, неблагоприятном для фаговой инфекции. Полученные данные создают поле для дальнейших исследований в области фармакокинетики бактериофагов. В частности, представляется целесообразным установить причины значительной инактивации различных по биологическим свойствам фагов при прохождении через ЖКТ животных. Следует отметить, что полученные результаты свидетельствуют о безопасности фаговых препаратов для резидентной микрофлоры даже при наличии перекрестной активности *in vitro*. С другой стороны наши данные ставят под сомнение эффективность фаговой терапии против длительно персистирующих популяций патогенных микроорганизмов при дисбиозах кишечника. Необходимо, однако, проведение дополнительных исследований для выяснения особенностей фармакодинамики фаговых препаратов при патологических состояниях кишечника, в том числе при диарее.

#### **T116 ОСОБЕННОСТИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА И ТЕЧЕНИЕ ПРОЦЕССА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

О.Т. Титаренко, М.Е. Дьякова, Д.С. Эсмедяева,  
О.А. Маничева, М.З. Догондзе, Т.Л. Перова,  
Н.Н. Мельникова

ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИФ МЗ РФ»,  
Санкт-Петербург

**Целью** настоящего исследования явилось изучение соотношения маркеров воспалительного ответа

и течения процесса у больных инфильтративным туберкулезом легких в зависимости от генотипа и других свойств *Mycobacterium tuberculosis*.

**Дизайн.** Параметры «хозяина». Определяли белки острой фазы воспаления (БОФ) в крови 42 впервые диагностированных нелеченных пациентов с инфильтративным туберкулезом легких (церулоплазмин – ЦП, гаптоглобин – ГП, С-реактивный белок (СРБ), орозомукоид (АГП), эластазу (Эл),  $\alpha_1$ -протеазный ингибитор ( $\alpha_1$ -ПИ), неоптерин, аденозиндезаминазу (АДА), бактерицидную активность фагоцитов по НСТ-тесту) до лечения. Результат лечения оценивали по клинико-рентгенологическим и бактериологическим данным после 3 месяцев адекватной противотуберкулезной терапии. Закрытие полости распада и абацилирование рассматривали как «значительное улучшение» (ЗУ), только абацилирование – как «улучшение» (У). 2) Параметры «патогена». *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) выделяли до начала лечения, определяли генотип штамма, лекарственную устойчивость (ЛУ), цитотоксичность (ЦТ). Данные анализировали с учетом принадлежности Mtb к генотипу Beijing (Mtb-B) или к другим семействам и по результатам лечения. Для статистического анализа данных использован пакет прикладных программ Statistica 7.0.

**Результаты.** Обнаружено, что ЗУ и У имеет место при выделении Mtb любого генотипа. Однако пациенты с Mtb генотипа Beijing (Mtb-B) характеризовались меньшей частотой (41% против 70%,  $p = 0,05$ ) ЗУ, что сопровождалось сочетанием высоких уровней БОФ, ЦТ, ЛУ, НСТ-нейтрофилов. Уровни БОФ в пределах референтных значений коррелируют с ЗУ, а их высокий уровень – с У (сохранение полости через 3 месяца терапии). Дискриминантный анализ выявил, что из спектра БОФ использование 4-х показателей (ЦП, ГП, Эл и АДА) обеспечивает точность прогноза течения процесса у 95,2% пациентов с Mtb-B и у 100% пациентов с Mtb других генотипов, без учета генотипа – 92,5%.

**Заключение.** В системе «хозяин-патоген» течение процесса определяется параметрами хозяина, оцениваемыми по уровню БОФ до начала лечения. Учет свойств Mtb существенно не повышает точность прогноза.

#### **T117 СИНДРОМ ЭНДОЭКОЛОГИЧЕСКОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ**

Е.И. Ткаченко

СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Выдвинута гипотеза о существовании нового синдрома эндоэкологической недостаточности, основные постулаты которого приведены ниже.

1. Гармоничные отношения человека с окружающим миром и эндоэкологией – решающее условие его социального благополучия и здоровья.

2. Человеческий организм + микробиота – надорганизменная система.

3. Заболевания внутренних органов – следствие нарушенных взаимоотношений человека и его эндоэкологии, приводящие к нарушению регуляции метаболического фенотипа (изменения в экспрессии генов, транскрипционных профилей генома РНК-тканей) с развитием последующих морфофункциональных изменений органов – болезней.

4. Для синдрома эндоэкологической недостаточности характерно наличие дисбиоза, кишечной

диспепсии, метаболических и трофологических расстройств.

5. Лечение и профилактика заболеваний внутренних органов, кроме применения агонистов (антагонистов) рецепторно-функциональных ансамблей, должны включать коррекцию метаболического профиля заболеваний, в том числе путем программирования питанием.

### **T118 ЭФФЕКТИВНОСТЬ НЕТИЛМИЦИНА НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИОННО-ТОКСИЧЕСКОЙ ЧУМЫ БЕЛЫХ МЫШЕЙ**

**А.В. Тришина, Л.М. Веркина, И.А. Шипелева, Л.А. Егизарян**

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия*

При наличии высокоэффективных средств этиотропной терапии среднестатистическая смертность от чумы не снижается (10–15%) и при этом начало вспышек характеризуется 100% летальностью. Известно, что антибактериальная терапия при сепсисе может осложняться выбросом токсических продуктов из разрушенных бактерий, усиливающих интоксикацию макроорганизма.

**Цель работы** – оценить эффективность нетилмицина в сравнении со стрептомицином и гентамицином на стадии клинически выраженного течения инфекции, используя дозы препаратов, эквивалентные среднесуточным (максимальным) человеческим дозам. В экспериментах использовали высоковирулентные изогенные штаммы чумного микроба 231 F1<sup>+</sup> и 231 F1. Доза заражения – 1000 ЛД<sub>50</sub>. Для прогнозирования клинической эффективности антибактериальной терапии были использованы две модели экспериментальной чумы: традиционная (подкожное инфицирование белых мышей суспензиями бактерий в изотоническом растворе хлорида натрия) и инфекционно-токсическая (подкожное заражение животных бактериями *Yersinia pestis* после их преинкубации в гемолизате эритроцитов человека). Антибиотики вводили белым мышам 1 раз в сутки через 24 ч после инфицирования (курс 7 суток). Значения ЕД<sub>50</sub> рассчитывали по модифицированному методу Кербера. Перерасчет доз для мышей проводили по формуле, предложенной I.E. Paget, Y.M. Barnes, с учетом коэффициентов для мышей и человека.

**В результате** установлено, что представители аминогликозидов – стрептомицин и нетилмицин сохраняют эффективность не только при чумной инфекции, вызванной F1<sup>+</sup> и F1 штаммами чумного микроба, но и на этапе лечения токсико-септической формы инфекции. Так значения ЕД<sub>50</sub> этих препаратов при использовании традиционного метода заражения мышей и инфицирования микроорганизмами в гемолизате эритроцитов крови человека статистически достоверных различий не имели, что позволяет рекомендовать их применение на стадии развивающегося (развившегося) инфекционно-токсического шока. В то же время, терапевтическая активность гентамицина, рекомендованного для профилактики и лечения всех форм чумы, резко снижалась на модели инфекционно-токсической формы инфекции, что делает нецелесообразным его использование на поздних стадиях заболевания.

### **T119 ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ПРИВЕРЖЕННОСТЬ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ У ВИЧ-ПОЗИТИВНЫХ ЖЕНЩИН**

**И.М. Улюкин**

*Военно-медицинская академия им. СМ. Кирова, Санкт-Петербург, Россия*

Известно о феминизации эпидемии ВИЧ-инфекции, что обусловлено гетеросексуальной передачей ВИЧ женщинам половыми партнерами-наркопотребителями. Есть мнение о недостаточном осознании особенностей консультирования женщин, что является препятствием эффективному общению медицинских работников и пациенток [Беляева В.В., 2013]: так, консультирование требует большего времени, потому что личностными факторами здесь являются, в частности, эмоциональность, тревожность, ранимость, уязвимость, чувствительность респонденток, их низкая самооценка, боязнь одиночества. Это обусловлено тем, что женщины, как правило, воспринимают себя как личность в контексте своих взаимоотношений с другими людьми, изменения в отношениях с которыми являются для них наиболее значимыми и травмирующими [Беляева В.В., Козырина Н.В., 2011]. Отмечена дисгармония в ролевой структуре ВИЧ-позитивных женщин, низкий уровень реалистичности образа будущего и неразвитость его планирования, выраженная зависимость от мужей / партнёров, отношения с которыми отличаются нестабильностью [Верховцева Э.Ф., 2013]. Половая специфика психологической адаптации ВИЧ-инфицированных девушек-подростков заключается в пассивно-приспособительном характере личностного реагирования на болезнь, что клинически выражается в реакциях депрессивного круга [Гречаный СВ., 2013]. Есть мнение о взаимосвязи анемии и депрессии у молодых ВИЧ-инфицированных женщин, которая не зависит от таких потенциальных кофакторов, как семейный статус, наличие хронических вирусных гепатитов, уровня CD4-лимфоцитов [Хасанова Г.Р., Ибниева Л.Р., 2013]. Отмечено, что более низкий процент летальности ВИЧ-позитивных женщин с сочетанной инфекцией связан с более низким долевым процентом потребителей инъекционных наркотиков по сравнению с мужчинами, что, с другой стороны, находит свое отражение в более высокой приверженности АРВТ [Сергалиева А.Ш., Сорокина М.Е., 2013]. Однако в случае наркопотребления отмечено, что пациентки, не имея никакого истинного желания отказаться от потребления ПАВ или принимать АРВТ, оказываются в специализированном стационаре лишь по причине отсутствия жилья или средств к существованию [Городнова М.Ю., 2013], поэтому необходимо создание возможности выбора принятия специализированной помощи и формирование новой фигуры потребности, основанной, в частности, на разделении переживаний с другим (психотерапевтом), что приносит новый опыт и удовлетворяет потребность в принятии и принадлежности – а это лежит в основе формирования доверия к системе оказания мультипрофессиональной помощи, способствует вовлечению в неё. Считается, что более низкий уровень добровольного обследования женщин по сравнению с мужчинами имеет место не только вследствие менее рискованного поведения женщин, но и, в большей степени, вследствие моральных трудностей

личного свойства: факт проведения тестирования означает публичное признание своего рискованного поведения [Гиренко П.В., и др., 2013]. Отмечено, что, несмотря на меры, предпринимаемые в последние годы для улучшения медико-социальной помощи ВИЧ-позитивным женщинам, удовлетворенность ею остается недостаточно высокой, особенно социальной помощью, причём по мере увеличения длительности заболевания этот показатель значительно ухудшается [Чернявская О.А., Иоанниди Е.А., 2013]. Тем не менее, несмотря на проводимые профилактические мероприятия, отмечено следующее: в связи с тем, что у женщин в случае незащищенного контакта риск заражения примерно в три раза выше, чем у мужчин, вероятно, доля новых случаев заболевания среди женщин будет расти, и именно они будут связующим звеном при распространении заболевания из группы наркопотребителей в общую популяцию [Балашова Т.Н., и др., 2013].

### **T120 ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ *Mycobacterium tuberculosis*, ВЫДЕЛЕННЫХ В РАЗНЫХ КОГОРТАХ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ НА УРАЛЕ**

**Т.В. Умпелева, Н.И. Еремеева, М.А. Кравченко**  
ФГБУ «УНИИФ», Екатеринбург, Россия

Проведено MIRU-VNTR-генотипирование (15 локусов) 178 и 78 изолятов *M. tuberculosis*, полученных от впервые выявленных (ВВ) и ранее леченых (РЛ) больных туберкулезом соответственно. Принадлежность изолятов к генетическим линиям определяли с использованием онлайн базы данных «MIRU-VNTRplus». Установлено доминирование изолятов возбудителя туберкулеза генотипа Beijing, доля которых в группе РЛ больных (80,8%) существенно превышала таковую (55,1%) в группе ВВ больных ( $p = 0,0002$ ). Уровень кластеризации изолятов Beijing составил 65,3% в группе ВВ больных и 84,1% в группе РЛ больных, что свидетельствует об активной трансмиссии штаммов *M. tuberculosis* данного генотипа. Группа non-Beijing была представлена изолятами следующих генотипов: LAM (12,9% – ВВ и 8,9% – РЛ), URAL (11,8% – ВВ и 5,1% – РЛ), Haarlem (7,9% – ВВ и 2,6% – РЛ). Определить принадлежность к генетической линии изолятов от 11,2% ВВ больных и 2,6% РЛ больных не удалось (Unknown). Уровень кластеризации изолятов non-Beijing, полученных от ВВ больных, составил 35%, что достоверно меньше чем в изолятов генотипа Beijing ( $p = 0,02$ ). Генетические профили изолятов non-Beijing, полученные от РЛ больных не повторялись.

Лекарственную устойчивость изолятов к противотуберкулезным препаратам оценивали методом абсолютных концентраций. Доля изолятов *M. tuberculosis*, обладающих множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), в группе РЛ больных (78,2%) более чем в два раза превышала этот показатель в группе ВВ больных (34,3%). Среди изолятов с МЛУ 75,4% в группе ВВ больных и 86,9% в группе РЛ больных принадлежали к генотипу Beijing.

**Заключение.** Эпидемиологическая значимость МЛУ штаммов *M. tuberculosis* генотипа Beijing неоднократно подчеркивалась в работах, посвященных изучению структуры российских популяций возбудителя туберкулеза. Данное исследование еще раз подчеркивает необходимость модернизации системы ТБ контроля, которая должна опираться на данные молекулярно-генетических исследований.

### **T121 ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ – ХОЗЯЕВ БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ БИОЗАЩИТЫ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ**

**У.В. Фальковская<sup>1</sup>, А.Н. Калинина<sup>2</sup>, С.П. Синеокий<sup>2</sup>, А.В. Сидоренко<sup>1</sup>, Г.И. Новик<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>ФГУП «ГосНИИгенетика», Москва, Россия

Использование бактериофагов для защиты растений от бактериозов имеет большое практическое значение для сокращения использования химических веществ в сельском хозяйстве. К настоящему времени большое количество бактериофагов обнаружено и охарактеризовано у представителей фитопатогенных бактерий *Erwinia amylovora*. Кроме того, недавно началось интенсивное исследование фагов бактерий *Pectobacterium carotovorum*. Определенный интерес вызывают также фаговые системы бактерий *Pantoea agglomerans*, которые, как эпифиты, тесно ассоциированы со многими растениями.

В Институте микробиологии НАН Беларуси проводится научно-исследовательская работа по созданию препарата на основе бактериофагов для защиты сельскохозяйственных растений от фитопатогенных бактерий. Необходимо отметить, что для разработки эффективных мер по защите сельскохозяйственных культур от болезней методом фаговой терапии необходимо знание биологической природы фитопатогенных возбудителей – хозяев бактериофагов.

Цель данного исследования – фенотипическая и молекулярно-генетическая идентификация фитопатогенных бактерий – хозяев бактериофагов, выделенных из растений с признаками бактериоза на территории Беларуси.

Выполнена фенотипическая и молекулярно-генетическая идентификация на основании анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК для 16 штаммов фитопатогенных бактерий, выделенных на территории Беларуси и депонированных в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов. В результате выполненных исследований шесть штаммов отнесены к виду *Pectobacterium wasabiae*: БИМ В-88, БИМ В-89, БИМ В-90, БИМ В-630, БИМ В-561 БИМ В-771; четыре штамма – к виду *Pectobacterium carotovorum*: БИМ В-560, БИМ В-631, БИМ В-632, БИМ В-633, три штамма отнесены к виду *Pantoea agglomerans*: БИМ В-242, БИМ В-281, БИМ В-562; два штамма к виду *Pantoea vagans*: БИМ В-345, БИМ В-97, один штамм – к виду *Pantoea sp.*

Совокупность использованных методов идентификации способствует успешному подбору бактериофагов для создания препаратов для биозащиты сельскохозяйственных культур.

### **T122 БАКТЕРИОФАГИ РОДА *BACILLUS* И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

**Н.А. Феоктистова<sup>1</sup>, Д.А. Васильев<sup>1</sup>, С.Н. Золотухин<sup>1</sup>, А.В. Алешкин<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО УГСХА им. П.А. Столыпина, Ульяновск, Россия

<sup>2</sup>ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия

Многочисленными научными работами доказано, что всестороннее изучение бактерий рода *Bacillus* не должно ограничиваться только *Bacillus anthracis*. Контаминация пищевого сырья и продуктов пи-

тания бактериями *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides* всех на этапах технологического процесса — это серьезная проблема пищевых производств. Пищевые токсикоинфекции, вызванные вышеперечисленными бактериями, характеризуются острым течением болезни и могут вызвать летальный исход.

С помощью специфичных фагов можно выявлять в пищевых продуктах вышеперечисленные бактерии. Доказано, что выделенные нами классическим методом бактерии *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides* можно идентифицировать за 4 суток, используя схему выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы, применение методик фагоиндикации сокращает время исследования до 25 часов. Так, реакция нарастания титра фага позволяет менее чем за сутки обнаружить вышеперечисленные бактерии в объектах санитарного надзора жидкой и плотной консистенции в концентрации 100 и 1000 м.к. /г., соответственно.

Применение созданных нами фаговых бациллярных биопрепаратов позволит контролировать микробиологическую чистоту сырья растительного и животного происхождения при приемке на перерабатывающее предприятие, осуществлять контроль параметров технологического процесса производства продуктов питания, применяя фаговые биопрепараты в различных методиках (реакция нарастания титра фага, реакция адсорбции фагов, фаготетразоловый метод, пробирочный метод, метод стекающей капли), анализировать качественный и количественный состав выделенных бацилл, являющихся причиной не только порчи продуктов питания, но и возбудителями пищевых токсикоинфекций, и разрабатывать контрольные меры для исключения рисков или уменьшения их возможности до приемлемого уровня (дополнительная тепловая обработка, установление гигиенического барьера и т.п.).

### **T123 ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СХЕМЫ ФАГОТИПИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ *BACILLUS CEREUS***

Н.А. Феоктистова<sup>1</sup>, А.И. Калдыраев<sup>1</sup>, Д.А. Васильев<sup>1</sup>, С.Н. Золотухин<sup>1</sup>, А.В. Алешкин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО УГСХА им. П.А. Столыпина, Ульяновск, Россия

<sup>2</sup>ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия

Бактерии *Bacillus cereus* относятся к грамположительным факультативно-анаэробным, подвижным, споробразующим, палочковидным бактериям, широко распространенным в окружающей среде (почве, пресной и морской воде, кишечнике беспозвоночных, на растениях и т.д.) и имеющим фенотипические и генетические (16S рРНК) признаки, сходные с рядом других видов бактерий рода *Bacillus*: *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis* и *B. anthracis*.

Селекционированные нами 57 фагов были разделены на 18 групп, на основе которых разработана схема фаготипирования, позволяющая типировать бактерии *B. cereus* на 18 фаговаров. Лизируемые культуры сравниваются со схемой фаготипирования и тестируемому штамму бацилл присваивается название группы фага, которой он лизируется (например, фаговар *I-Tun Bc* — № штамма).

С учетом строгой родовой специфичности бактериофагов, была разработана схема ускоренной идентификации *B. cereus* в пробах пищевых продук-

тов с использованием набора специфичных фаговых биопрепаратов. Для оценки эффективности ускоренного диагностического алгоритма в процессе производственных испытаний, параллельно с ними осуществляли идентификацию *B. cereus*, используя традиционную схему по ГОСТ 1044.8-88 «Продукты пищевые. Методы определения *Bacillus cereus*».

Процедуру ускоренной идентификации проводили следующим образом: на поверхность МПА в чашках Петри пастеровской пипеткой наносили 18–24 часовую бульонную культуру исследуемых микроорганизмов. Чашки термостатировали в течение 15–20 минут для подсушивания, а затем, предварительно поделив на 7 секторов, на поверхность засеянной среды пастеровской пипеткой в размеченные сектора вносили поочередно 18 биопрепаратов с *I-Фаг BcУГСХА* по *18-Фаг BcУГСХА*. Для исследования 1 бактериальной культуры в опыте использовали 3 чашки Петри с МПА.

По результатам производственных испытаний было установлено, что новый диагностический метод позволяет идентифицировать бактерии *B. cereus* за 52 часа, в то время как по традиционной бактериологической схеме идентификации проводится в течение 96–120 часов. Таким образом, разработанный алгоритм диагностики бактерий *B. cereus* с помощью набора специфичных биопрепаратов бактериофагов, не только существенно сокращает время проведения процедуры идентификации, но и предполагает дополнительное типирование данного вида бацилл на фаговары.

### **T124 АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ *BACILLUS SUBTILIS* В ОБЪЕКТАХ САНИТАРНОГО НАДЗОРА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ И РЕАКЦИЕЙ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА**

Н.А. Феоктистова<sup>1</sup>, М.А. Лыдина<sup>1</sup>, Д.А. Васильев<sup>1</sup>, С.Н. Золотухин<sup>1</sup>, А.В. Алешкин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО УГСХА им. П.А. Столыпина, Ульяновск, Россия

<sup>2</sup>ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия

В период с 2010 по 2014 гг. было исследовано на наличие бактерий *Bacillus mesentericus* 25 проб хлеба из муки пшеничной высшего и первого сортов, 30 проб муки пшеничной высшего и первого сортов, 55 проб специй, приобретенных в Ульяновской и Самарской областях, 65 проб почвы различного хозяйственного значения. Выделение бактерий вида *Bacillus mesentericus* проводили по классической схеме выделения и идентификации бацилл первой морфологической группы, которую дополнили тестами на определение ферментативной активности выделенных бактерий по Сидорову (1995). Время исследования 107 часов. Обнаружено 55 культур бактерий вида *Bacillus mesentericus* при исследовании 175 проб объектов санитарного надзора. Уровень контаминации исследуемых пищевых продуктов бактериями *Bacillus mesentericus* составил 31%.

Для ускоренной индикации бактерий вида *Bacillus mesentericus* в пищевом сырье и продуктах питания без выделения чистой культуры, нами была разработана модель постановки реакции нарастания титра фага на пищевом сырье и продуктах питания, максимально подтвержденных контаминации вышеперечисленными бактериями. Использовали муку пшеничную высшего и первого сортов, персики, перец черный молотый, мясо — свинину.

Подготовку и посев проб пищевых продуктов, подлежащих исследованию, проводили в соответ-

ствии ГОСТ 26669–85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов».

Доказано, что увеличение титра фагов Bm–3 и Bm–8 серии УГСХА в 5 раз произошло при концентрации  $10^3$  м.к. бактерий *Bacillus mesentericus* в 1 г объектов исследований. Данная концентрация бактерий в пищевом сырье и продуктах питания считается пороговой для их отбраковки или вторичной переработки с использованием соответствующих технологий.

Создана схема ускоренной индикации бактерий *Bacillus mesentericus* методом реакции нарастания титра фага с использованием биопрепарата на основе фагов Bm–3 УГСХА и Bm–8 УГСХА, которая позволяет обнаружить бактерии в концентрации  $10^3$  м.к./г пищевого сырья и продуктов питания за 25 часов.

Применение бактериологического метода и реакции нарастания титра фага при проверке эффективности методики позволяет нам сделать вывод о том, что фагоиндикация экономически целесообразна, так как метод менее трудоемок и позволяет обнаружить искомый штамм бактерий без выделения чистой культуры.

#### **T125 БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИОФАГОВ *BACILLUS MYCOIDES***

Н.А. Феоктистова<sup>1</sup>, Д.А. Макеев<sup>1</sup>, Д.А. Васильев<sup>1</sup>,  
А.В. Алешкин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО УГСХА им. П.А. Столыпина, Ульяновск, Россия  
<sup>2</sup>ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия

Изучения литической активности селекционированных фагов *Bacillus mycoides* проводили методом агаровых слоев. Экспериментальным путем установлено, что литическая активность фагов колеблется в диапазоне от  $10^6$  до  $10^{12}$  БОЕ/мл. Для изучения спектра литического действия селекционированных фагов использовали 11 штаммов бактерий *Bacillus mycoides*, выделенных из проб пищевого сырья и продуктов питания и 1 штамм, полученный из музея НИИЦМиБ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина». Исследования проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры методом «стекающая капля». Доказано, что изучаемые бактериофаги имеют различный диапазон действия по отношению к 12 изучаемым штаммам *Bacillus mycoides*. Опыты демонстрируют, что наиболее широким спектром литического действия обладают штаммы фагов В.мус–3 и В.мус–5 серии УГСХА, совокупный процент лизиса которых составил 91,7 %.

Изучение специфичности 5 выделенных и селекционированных изолятов фагов *Bacillus mycoides* мы проводили на культурах гомологичного рода: бактериях *Bacillus cereus* и *Bacillus thuringiensis*, входящих в группу «*Bacillus cereus*», используя метод «стекающая капля» Полученные результаты свидетельствуют, что все изучаемые бактериофаги, строго специфичны в пределах вида *Bacillus mycoides* и могут быть компонентами биопрепарата для индикации и идентификации бактерий *Bacillus mycoides*.

Для конструирования биопрепарата для фагоиндикации и фагоидентификации бактерий *Bacillus mycoides* нами было выбрано два фага В.мус–3 и В.мус–5 серии УГСХА, которые характеризовались высокими титрами литической активности и максимально широким совокупным спектром ли-

тического действия. Определено, что бактериофаги в течение 12 месяцев снижали показатели литической активности с  $10^{12}$  до  $10^7$  БОЕ/мл. Известно, изменение литической активности фагов в диапазоне  $10^7$ – $10^9$  не является критическим при конструировании биопрепарата и не отразится на его способности лизировать культуры в пищевом сырье и продуктах питания при проведении исследований по их индикации и идентификации.

Таким образом, нами впервые выделены из проб почвы и изучены по основным биологическим свойствам бактериофаги специфичные в отношении *Bacillus mycoides*. Созданный на базе производственно-перспективных штаммов бактериофагов Bm–3 УГСХА и Bm–5 УГСХА диагностический биопрепарат обладает высоким титром вирусных частиц, широким спектром литической активности и стабильностью при хранении в течение года.

#### **T126 СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА И РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА ДЛЯ ИНДИКАЦИИ *BACILLUS MYCOIDES* В ОБЪЕКТАХ САНИТАРНОГО НАДЗОРА**

Н.А. Феоктистова<sup>1</sup>, Д.А. Макеев<sup>1</sup>, Д.А. Васильев<sup>1</sup>,  
С.Н. Золотухин<sup>1</sup>, А.В. Алешкин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО УГСХА им. П.А. Столыпина, Ульяновск, Россия  
<sup>2</sup>ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия

В результате исследования 537 образцов воды, пищевых продуктов, сельскохозяйственных растений и почвы обнаружен высокий уровень контаминации данных объектов санитарно-эпидемиологического надзора бактериями *Bacillus mycoides* достигающий 18,6%, требующий постоянного мониторинга со стороны Роспотребнадзора для предотвращения спорадических случаев и вспышек пищевых токсикоинфекций.

Полученные штаммы по своим фенотипическим характеристикам полностью соответствовали *Bacillus mycoides*: обладали положительными реакциями на казеин, желатин, каталазу, глюкозу и крахмал, отрицательной на лактозу и преобразовывали нитраты в газообразный азот, культивировались на агаре в анаэробных условиях при температуре 10–40°C и рН среды равном 5.7. Все выделенные штаммы бактерий были палочкообразной формы, образовывали споры, отмирающие при кипячении в течение не более 10 мин при 100°C, не формировали капсул. На МПА бациллы вырастали в виде корневидных колоний серо-белого цвета, напоминающие мицелий гриба. Время исследования по бактериологической схеме составило 107 часов.

В дальнейшем, мы использовали разработанную схему постановки реакции нарастания титра фага с применением фагового биопрепарата для индикации бактерий *Bacillus mycoides* на образцах пищевого сырья и продуктов питания, максимально подверженных заражению вышеназванными бактериями.

В качестве объектов исследования использовали пробы воды, специй (красный молотый перец, корица) и мяса (говядина и баранина). В результате проведенной серии экспериментов показано, что увеличение титра фагов Bm–3 и Bm–5 серии УГСХА в 10 раз происходило при уровне загрязнения объектов исследований бактериями *Bacillus mycoides* равном  $10^4$  БОЕ/г. Данная концентрация бактерий в пищевом сырье и продуктах питания считается пороговой



для их отбраковки или вторичной переработки с использованием соответствующих технологий. Время исследования 25 часов.

Разработана схема идентификации бактерий *Bacillus mycoides* с помощью сконструированного биопрепарата, позволяющая идентифицировать микроорганизмы за 32 часа, что более чем в три раза сокращает срок бактериологического исследования по традиционной схеме выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы.

#### **T127 РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ФАГОИНДИКАЦИИ *BACILLUS MEGATERIUM* В МЯСНЫХ И РЫБНЫХ ТОВАРАХ**

Н.А. Феоктистова<sup>1</sup>, Н.А. Петрукова<sup>1</sup>, Д.А. Васильев<sup>1</sup>,  
С.Н. Золотухин<sup>1</sup>, А.В. Алешкин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО УГСХА им. П.А. Столыпина, Ульяновск, Россия

<sup>2</sup>ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия

В Российской Федерации на сегодняшний день отсутствуют данные о созданных фаговых биопрепаратах, в том числе диагностических, специфичных в отношении бактерий *Bacillus megaterium*. Разработка бактериофаговой тест-системы позволит не только ускорить процедуру по идентификации вышеназванных бактерий в продуктах питания и клинических образцах, но и даст возможность дифференцировать бациллы фаговары и фаготипы

Метод фагоиндикации бактерий *Bacillus megaterium* с использованием фагового биопрепарата разрабатывался на основе методики реакции нарастания титра фага. Первоначально, для конструирования биопрепаратов для биосенсорной детекции бактерий *Bacillus megaterium* было отобрано два фага *B.meg* – 1 и *B.meg* – 10 серии УГСХА, которые характеризовались высокими показателями литической активности и максимально широким совместным спектром литического действия. Очистка фагов от бактериальных клеток осуществлялась методом фильтрации с использованием мембранных фильтров фирмы Millipore (filter type: 0,22 µm GV). Были проведены эксперименты постановки реакции нарастания титра фага на мясо-пептонном бульоне (МПБ), контаминированном 18-часовой индикаторной культурой (*Bacillus megaterium* 4, *Bacillus megaterium* 182) в концентрации 10<sup>3</sup> КОЕ/мл.

Учет результатов проводили согласно оценке, предложенной В.Я. Ганюшкиным (1988). Если увеличение количества корпускул бактериофага *Bacillus megaterium* в опытной пробе по отношению к количеству корпускул бактериофага в контроле составляло менее 5 раз, то реакция считалась положительной, если менее, то сомнительной. Экспериментальным путем нами установлено, что количество бляшкообразующих единиц в опыте, более чем в 5 раз превышает количество бляшкообразующих единиц в контроле.

Результаты эксперимента свидетельствуют, что 26 часов – это оптимальный временной параметр постановки (РНФ): 0,5 часа – подготовка реакции + 7 часов – время экспозиции субстрата с фагом + 0,5 часа – время, затрачиваемое на постановку эксперимента + 18 часов – время термостатирования посевов).

По результатам проведенной серии опытов установлено, что увеличение титра фагов в 5 раз произошло при концентрации 10<sup>3</sup> м.к. бактерий *Bacillus megaterium* – в 1 г говядины и баранины, скумбрии и сельди.

Доказана возможность применения РНФ с целью обнаружения бактерий *Bacillus megaterium* в объектах санитарного надзора, позволяющая сократить время исследования, уменьшить расход питательных сред и лабораторной посуды, повысить эффективность обнаружения картофельной палочки.

#### **T128 СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ УСТОЙЧИВЫХ К РИФАМПИЦИНУ, ИЗОНИАЗИДУ И ПИРАЗИНАМИДУ ИЗОЛЯТОВ *Mycobacterium tuberculosis***

М.Л. Филипенко<sup>1</sup>, М.А. Дымова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН

Антибиотикоустойчивость у микобактерий туберкулезного комплекса – достаточно хорошо изученное явление с точки зрения молекулярно-генетических механизмов. В данной работе предлагается способ выявления устойчивых к рифампицину, изониазиду и пипразинамиду изолятов *M.tuberculosis*, путем определения мутаций в гене *rpoB*, *katG*, *pncA*, ассоциированных с формированием устойчивости к рифампицину, изониазиду и пипразинамиду, соответственно. В частности, используется ПЦР в режиме «реального времени» с последующим HRM-анализом. В процессе амплификации формируются «искусственные» гетеродуплексы за счет одновременной коампликации ДНК дикого типа и тестируемой ДНК, что может увеличить надежность анализа. HRM-анализ выполняется с помощью «Precision Melt Analysis™ Software» («Bio-Rad», США). Специфичность реакции амплификации подтверждают по отсутствию дополнительных пиков на кривой плавления, и дополнительных бэндов на электрофореграмме. Разработанный способ выявления мутаций в указанных генах обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Стоит отметить, что разработанный подход к анализу точковых мутаций может подходить и для анализа других нуклеотидных замен, представляющих научный и практический интерес.

#### **T129 ПИТАНИЕ И ИНТЕЛЛЕКТ, ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИКОВ**

А.В. Шабров<sup>1</sup>, Ю.П. Успенский<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО «ПСПбГМУ им. И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Принято считать, что интеллект на 70% является биологически обусловленным и на 30% определяется влиянием факторов окружающей среды. Существуют биологические основы наследственной функции интеллекта, к которым относятся дефектность передачи информации на синаптическом уровне, нарушения в строении миелиновых оболочек нейронов и др.

Известно, что умственный процесс является энергоемким, подтверждением чего служит увеличение потребления глюкозы с 12 до 59%. Мозг человека отличается по потребностям в аминокислотах, многие из которых являются предшественниками медиаторов ЦНС, активно участвуя не только в обусловленности синаптической активности клеток ЦНС, но и способствуя обеспечению оптимальных условий роста нейрона за счет формирования микроокружения. По мнению разработчика доктрины интеллекта Г.Ю. Айзенка попытки повлиять на

интеллект посредством использования социальных, педагогических, экологических усилий оказались безрезультатными, единственно возможным способом является **улучшение питания**.

Существует связь между белковым метаболизмом и состоянием интеллекта индивидуума. Витамины B6 и B12 оказывают наибольшее влияние на процессы запоминания, усвоения, переработки информации, память и внимание. L-карнитин является единственным переносчиком свободных жирных кислот в цитоплазму митохондрий, именно их потребление необходимо для продвижения аксоплазмы в нейронах. Йод-дефицит в детском возрасте приводит к снижению функциональной активности щитовидной железы, что оказывает отрицательное влияние на формирование ЦНС и процессы высшей нервной деятельности.

Важны перспективы применения пробиотиков в целях коррекции интеллектуально-мнестических функций, поскольку известно, что микробиота оказывает системное нейрорепродуцирующее действие, иными словами речь должна идти о функциональном питании с использованием средств, улучшающих состояние кишечной микроэкологии.

Таким образом, имеются все предпосылки для выделения отдельного направления в науке о питании — *нейропсихонутрициологии*, предметом изучения которой следует считать интегральную оценку взаимосвязи действия компонентов пищи скорость умственных реакций, оперативное и абстрактное мышление и, в конечном итоге, на уровень интеллекта.

#### **T130 ГЕНОМНОЕ И ФЕНОГЕНЕТИЧЕСКОЕ СРАВНЕНИЕ TL И CNU, НОВЫХ БАКТЕРИОФАГОВ ВИДА PaP3/LUZ24-ПОДОБНЫХ ФАГОВ, ИНФИЦИРУЮЩИХ PSEUDOMONAS AERUGINOSA**

О.В. Шабурова<sup>1</sup>, Е.А. Плетенева<sup>1</sup>, М.В. Буркальцева<sup>1</sup>, Л. Кулаков<sup>2</sup>, Д. Магилл<sup>2</sup>, К. Пурсель<sup>3</sup>, Е.Н. Чеснокова<sup>1</sup>, А.М. Каплан<sup>1</sup>, В.Н. Крылов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН

<sup>2</sup>School of Biological Sciences, The Queen's University of Belfast, Medical Biology Centre, Northern Ireland.

<sup>3</sup>Univ Paris-Sud, Institut de Génétique et Microbiologie, Orsay, France.

Неконтролируемое использование антибиотиков привело к возникновению и распространению множественно-устойчивых штаммов патогенных бактерий. В этой связи большой интерес проявляется к бактериофагам, как антибактериальным агентам. Но широкое применение фаговых смесей ограничивается значительной ролью фагов в эволюции бактериальных патогенов. Умеренные бактериофаги могут нести фрагменты бактериальной ДНК и интегрировать их в геномы различных бактерий. Активность вирулентных фагов приводит к селекции фагоустойчивых патогенных бактерий. Горизонтальный перенос генов фагами может приводить к приобретению бактериями новых вирулентных свойств. Существование «островов патогенности» фаговой природы показано при изучении клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. Это требует детального изучения взаимодействий фагов и бактерий. В первую очередь необходимо убедиться в отсутствии у фагов генов, кодирующих опасные продукты. Частично это может быть достигнуто секвенированием и аннотированием генома нового фага. Однако несмотря

на рост доступных баз данных, геномы фагов содержат некоторое количество открытых рамок считывания, кодирующих продукты с неизвестными, а следовательно, потенциально небезопасными функциями. Сравнение развития родственных фагов на клинических изолятах - феногенетические исследования - позволит выявить особенности этих фагов, важные для оценки их безопасности.

Были изучены свойства двух новых природных литических бактериофагов *P. aeruginosa*, TL и CU, из группы PaP3/LUZ24-подобных фагов, секвенированы и аннотированы их геномы. Оба фага имеют широкий спектр литической активности и лизируют некоторые слизистые клинические штаммы *P. aeruginosa*. Они образуют очень мутные бляшки на лабораторном штамме *P. aeruginosa* PAO1, что связано с внутриклеточным ограничением развития, но хорошо растут в присутствии некоторых плазмид IncP2 группы несовместимости. Фаги, родственные этим фагам обнаруживаются в коммерческих лечебных смесях, производимых в России и были предложены для использования в терапии в западных странах. При росте на газонах некоторых клинических штаммов эти фаги нестабильны и выщепляют варианты с различными типами бляшек. Такой же эффект может быть получен и на производные лабораторного штамма PAO1. Мы проводим изучение этих бактериофагов чтобы понять происхождение их нестабильности и ее возможных последствий в ходе практического использования фагов.

#### **T131 ИССЛЕДОВАНИЕ СИНЕРГИЗМА ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ L,D-ПЕПТИДАЗЫ БАКТЕРИОФАГА T5 И ПЕРМЕАБИЛИЗУЮЩИХ МЕМБРАНУ АГЕНТОВ НА КЛЕТКАХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ**

М.С. Шаврина<sup>1,2</sup>, А.А. Зимин<sup>3</sup>, С.В. Чернышов<sup>2</sup>, Г.В. Микулинская<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Пушчинский государственный естественно-научный институт, Пушкино, Россия

<sup>2</sup>Филиал Института биоорганической химии РАН, Пушкино, Россия

<sup>3</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пушкино, Россия

Инфекции, вызванные грамотрицательными микроорганизмами, занимают большое место среди нозокомиальных инфекций; среди возбудителей много антибиотикорезистентных штаммов. Одной из альтернатив антибиотикам является использование пептидогликангидролаз (ПГ), чья активность, специфичность, низкая вероятность развития устойчивости, часто встречающаяся термостабильность и низкая иммуногенность дает им большие преимущества.

ПГ бактериофага T5 — ранее охарактеризованная нами L,D-пептидаза, специфичная к муреину грамотрицательных бактерий. В настоящей работе мы исследовали температурную чувствительность этого белка и показали, что он является термостабильным ферментом — сохраняет более 50% активности после 30-минутного прогрева до 80°C.

ПГ обычно рассматриваются как литические агенты только против грамположительных микроорганизмов, потому что их муреин не защищен наружной мембраной. В последнее время создаются химерные конструкции эндолизинов с мембраноактивными пептидами, специфичные к грамо-

трицательным микроорганизмам. Другой подход – использовать эндолизин совместно с агентами, способными увеличивать проницаемость наружной мембраны грамотрицательных клеток. Мы исследовали бактериолитическое действие на клетки *E. coli* и *P. aeruginosa* (PAO1) гомогенного препарата пептидаз фага T5 фермента в сочетании с пермебилизирующими агентами разных типов. В результате было показано, что при лизисе клеток *E. coli* фермент проявляет выраженный синергизм с пептидными антибиотиками – полимиксином В (5 мкг/мл) и грамицидином D (4 мкг/мл), – а также 50 мМ гидроксиамином (Трис). Синергизм наблюдался также с катионным пептидом (полилизин) и катионным детергентом (бромид цетилтриметиаммония). В случае *P. aeruginosa* (PAO1) выраженное синергическое действие наблюдалось в присутствии полимиксина В в концентрации 40 мкг/мл. Во всех случаях количество выживших КОЕ составляло единицы и не менее чем на порядок превышало контроль.

Работа была поддержана грантом РФФИ № 13-04-00991-а.

### **T132 ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ НАРУШЕНИЕ РЕГУЛЯРНОСТИ ЦИРКАДИАННОГО РИТМА КИШЕЧНИКА КАК ФАКТОР РИСКА ОРГАНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ТОЛСТОЙ КИШКИ**

**К.А. Шемеровский**

*ФГБУ НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия*

**Цель работы:** изучить значимость функционального запора в этиологии органических колоректальных болезней: (геморрой, колит, дивертикулез, рак).

**Материалы и методы:** Обследовано более 3000 работающих лиц, а также более 300 больных с геморроем, язвенным колитом, дивертикулезом и колоректальным раком. Применяли метод «Хроноэнтерографии» и тест «Качество здоровья» по модифицированному опроснику SF-36. Выделяли три стадии тяжести запора по частоте стула: I стадия запора (легкая) – при частоте 5–6 раз в неделю, II стадия (умеренная) – при частоте стула 3–4 р/нд, III стадия (тяжелая) – при частоте стула 1-2 р/нд.

**Результаты:** Запор I и II стадии был диагностирован у 90% больных геморроем, семейная предрасположенность – у 39%, злоупотребление алкоголем – у 20%, нерегулярное питание – у 9% больных. Запор является наиболее частым фактором риска геморроя. Среди больных язвенным колитом хронический запор в анамнезе выявлен у 100% пациентов, злоупотребление антибиотиками – у 92%, семейная предрасположенность – у 31%, а у 15% – стрессорное обострение колита. Запор оказался доминирующим фактором риска язвенного колита. При дивертикулярной болезни хронический запор в анамнезе выявлен у 57% пациентов, прием слабительных – у 42%, а наследственная предрасположенность – у 14%. Запор оказался почти в 4 раза более частым фактором риска дивертикулеза, чем наследственный фактор. Колоректальный рак (КРР) чаще всего был диагностирован в возрасте 70–79 лет (5% больных – II стадия КРР, 95% – III и IV стадии КРР), а наибольшая заболеваемость хроническим запором приходилась на возраст 40–49 лет, что свидетельствует об иницирующей роли хронического запора как фактора риска возникновения КРР.

**Вывод:** Хронический запор является одним из самых ранних факторов риска геморроя, язвенного колита, дивертикулеза и колоректального рака.

### **T133 СХЕМА ИНДУКЦИИ ПРОФАГА, ПОВЫШАЮЩАЯ ЧАСТОТУ МУТАЦИИ У БАКТЕРИЙ PSEUDOMONAS AERUGINOSA ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

**А.Г. Шестаков, Е.С. Малинов, Д.А. Васильев**

*ФГБОУ ВПО УГСХА им. П.А. Столыпина*

К индуцирующим агентам относятся ультрафиолетовые лучи (УФ), рентгеновские лучи и гамма-излучения, перекиси, азотистый иприт и его гомологи, этиленамин, урацил, многие антибиотики. Наиболее эффективные и широко применяемые индуцирующие факторы – УФ-лучи и антибиотик митомицин С. Нами разработана схема индукции профага в бактериях *Pseudomonas aeruginosa* путем воздействия УФ излучения. Нами установлено, что после первого цикла фаг сформировал 5 негативных колоний, после второго 93 негативных колонии, после третьего 218 негативных колоний. Выводы Лурия и Дельбрюка относительно устойчивости бактериофагов к УФ облучению были проверены нами на полевом штамме бактериофага Pa.УГСХА № 4. Установлено, что различие количества негативных колоний в опытной и контрольной чашках находятся в диапазоне доверительного интервала, менее 3%.

#### **Выводы:**

1. Многократность воздействия УФ лучей на бактерии позволяет наиболее эффективно использовать индукцию профага в сравнении с однократным воздействием.

2. Многократность воздействия УФ лучей на бактерии позволяет избирательно подбирать время воздействия, дозу УФ облучения и расстояние до облучаемых бактерий.

### **T134 ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BEIJING W0/W148 КЛАСТЕРА**

**Е.А. Шитиков<sup>1</sup>, Ю.А. Беспятых<sup>1</sup>, Д.С. Ищенко<sup>1</sup>, В.Ю. Журавлев<sup>2</sup>, П.К. Яблонский<sup>2</sup>, А.А. Вязовая<sup>3</sup>, И.В. Мокроусов<sup>3</sup>, О.В. Нарвская<sup>3</sup>, Е.Н. Ильина<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России, Москва

<sup>2</sup>СПб НИИФ Минздрава России, Санкт-Петербург

<sup>3</sup>ФБУН НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург

Туберкулез, вызываемый *M. tuberculosis* (MTB), является значимой проблемой здравоохранения и социального развития России. Среди MTB выделяют отдельные генетические линии, демонстрирующие высокую вирулентность и ассоциацию с лекарственной устойчивостью. В частности, такой «успешной» линией является клональная группа W0/W148 генотипа Beijing. В настоящем исследовании изучены особенности геномной организации таких штаммов.

В работе было проведено полногеномное секвенирование четырех образцов кластера W0/W148 на платформе GS FLX + (Roche, США). Полученные данные использованы для поиска однонуклеотидных полиморфизмов относительно генома референтного штамма H37Rv и сравнения с другими геномами MTB, представленными в GenBank в виде протяженных последовательностей (5 образцов) или чтений с приборов высокопроизводительного секвенирования (300 образцов).

На основании сравнительного филогенетического анализа представители кластера B0/W148 были отнесены к единой монофилетической группе, показавшей сходство со штаммом W-148, представленным в GenBank в виде одного скаффолда. Для группы определено 63 кластер-специфических полиморфизма. В результате исследования удалось выявить существенные изменения в генах, ответственных за метаболизм патогена (Rv0338c), и в генах эффлюксной системы (Rv1877 и Rv3728). Так же найдена нонсенс-мутация в гене Rv2719c, продукт которого участвует в клеточном делении.

Выравнивание генома W-148 на последовательность штамма H37Rv показало наличие двух больших инверсий в геноме W-148 (330 и 560 т.п.о.). Геномное секвенирование одного из образцов кластера B0/W148 с использованием библиотеки парных фрагментов и прибора Ion Torrent PGM (Life Technologies, США), гибридизационный анализ по Саузерну, а также ПЦР продемонстрировали наличие инверсий во всех тестируемых образцах. Согласно нашей гипотезе в ходе первого рекомбинационного события произошла инверсия протяженного сегмента хромосомы длиной 3 м.п.о. Вторая инверсия, произошедшая внутри измененного участка, затронула 2.1 м.п.о. и восстановила ориентацию части внутреннего сегмента хромосомы.

Описанные на основании сравнительной геномики полиморфизмы и рекомбинационные события отчасти объясняют «успешность» кластера B0/W148 и могут служить основой для создания систем генетического мониторинга семейства.

### **T135 АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ БИФИДОБАКТЕРИЙ — КОМПОНЕНТОВ ПРЕПАРАТОВ-ПРОБИОТИКОВ**

**В.А. Щетко<sup>1</sup>, Н.А. Головнева<sup>1</sup>, С.И. Жусупов<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>2</sup> Филиал РПП «Национальный центр биотехнологий»

Одним из аспектов использования пробиотиков в ветеринарии и медицине является восстановление нормальной микрофлоры после антибиотикотерапии. При этом применение пробиотиков часто проводится на фоне приема антибиотиков и других антибактериальных препаратов. В связи с этим исследование антибиотикорезистентности и ее при-

роды является важной характеристикой бактерий — потенциальных кандидатов на использование в составе пробиотических препаратов.

В работе определена чувствительность штаммов *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. bifidum* к антимикробным агентам с различным механизмом действия: аминогликозидам, макролидам, β-лактамам и антибиотикам тетрациклинового ряда.

Показано, что исследуемые штаммы бактерий наиболее чувствительны к бета-лактамам антибиотикам. Эритромицин и антибиотики тетрациклинового ряда также эффективно угнетают рост бифидобактерий. Наибольшую устойчивость указанные штаммы проявили к аминогликозидам.

Значительных различий в чувствительности к антибиотикам не выявлено, однако штаммы *B. adolescentis* характеризуются более высокой природной устойчивостью к пенициллиновым антибиотикам, аминогликозидам, левомицетину, эритромицину по сравнению со штаммами *B. bifidum* и *B. longum*.

Показано, что резистентность к антибиотикам у бифидобактерий изменяется в результате как спонтанного, так и индуцированного мутагенеза. В результате индуцированного мутагенеза с использованием нитрозогуанидина были получены жизнеспособные варианты *B. adolescentis*, устойчивые к пяти антибиотикам.

Варианты бактерий с повышенной устойчивостью к антибиотикам при пересеве на среды, включающие антибиотики, сохраняли жизнеспособность ( $10^7 - 10^8$  КОЕ/мл) в течение, по крайней мере, двух лет хранения, что свидетельствует о стабильности полученного признака устойчивости к антибиотикам. В результате мутации повышена устойчивость штаммов *B. adolescentis* к пенициллиновым антибиотикам в 12–25, к цефалоспорином — в 2–10 раз.

Характеристика свойств полученных в результате спонтанного и индуцированного мутагенеза вариантов бифидобактерий показала, что приобретение признака устойчивости к повышенным концентрациям антибиотиков не вызвало изменения морфологии исходных штаммов, кислотообразующей активности. Показано также, что исследуемые штаммы бифидобактерий не содержат плазмидную ДНК.