

ность наборов реагентов при выявлении РНК вирусов Эбола, Марбург, Ласса, Мачупо, ВЭЛ, ЛДР, бешенства методом ОТ-ПЦР. В экспериментах использованы препараты возбудителей, биологическая активность которых (концентрация биологически активного вируса) соответствует аналитической чувствительности метода ОТ-ПЦР.

Данные, представленные в табл. 3, свидетельствуют о том, что ВКО не оказывает влияния и на аналитическую чувствительность наборов реагентов при выявлении синтетической РНК вирусов Эбола, Марбург, Ласса, Мачупо, ВЭЛ, ЛДР, бешенства методом ОТ-ПЦР.

Заключение. Таким образом, для повышения достоверности результатов ПЦР-анализа, а также стандартизации диагностических наборов для выявления возбудителей опасных и особо опасных инфекционных заболеваний обосновано использование контрольных образцов на основе ГИК, которые не оказывают влияния на чувствительность метода при работе как с нативными возбудителями, так и с их синтетическими НК (специализированные контрольные образцы). В дальнейшем указанные контрольные образцы могут быть использованы для разработки стандартных образцов категорий «отраслевой стандартный образец» и «стандартный образец предприятия» при проведении внутрилабораторного контроля в соответствии с требованиями ГОСТ 8.315-91 «Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения».

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лакин Г.Ф. *Биометрия*. М.: Высшая школа; 1990.
2. Медведева Т.В., Скворцова Р.Г., Кузьменко В.В., Огарков О.Б. ПЦР-

анализ в клинической лаборатории. Учебное пособие. Иркутск: РИО ИГИУВа; 2009.

3. Сизикова Т.Е., Мельникова Е.В., Маношкин А.В., Петров А.А., Мельников Д.Г., Пантюхов В.Б. и др. Использование внешних и внутренних контрольных образцов при постановке полимеразной цепной реакции и обратной транскрипции полимеразной цепной реакции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 3: 41-4.
4. Зорина В.В. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР). Методическое пособие. М.: ООО «ДНК-Технология»; 2012.
5. Инструкция по применению набора pGEM®-T и pGEM®-T Easy Vector Systems, part # TM042, Promega (США).

REFERENCES

1. Lakin G.F. *Biometrics [Biometriya]*. Moscow: Vysshaya shkola ; 1990. (in Russian)
2. Medvedeva T.V., Skvortsova R.G., Kuzmenko V.V., Ogarkov O.B. *PCR – analysis in clinical laboratory [PCR-analiz v klinicheskoy laboratorii]*. Uchebnoe posobie. Irkutsk: RIO IGIUVa; 2009. (in Russian)
3. Sizikova T.E., Melnikova E.V., Manoshkin A.V., Petrov A.A., Melnikov D.G., Pantyukhov V.B. et al. The application of external and internal control objects in case of using of polymerase chain reaction and reverse transcription of polymerase chain reaction. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 3: 41-4. (in Russian)
4. Zorina V.V. *Basics of polymerase chain reaction. [Osnovy polimeraznoy tsepnoy reaktzii (PCR)]*. Metodicheskoe posobie. M.: ООО «ДНК-Технология»; 2012. (in Russian)
5. Instructions for use pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, part # TM042, Promega (USA).
6. Wei B., Wei Y., Zhang K., Yang C., Wang J., Xu R. et al. Construction of armored RNA containing long-size chimeric RNA by increasing the number and affinity of the pac site in exogenous rna and sequence coding coat protein of the MS2 bacteriophage. *Intervirology*. 2008; 51(2): 144-50.
7. Yu X.F., Pan J.C., Ye R., Xiang H.Q., Kou Y., Huang Z.C. Preparation of armored RNA as a control for multiplex real-time reverse transcription-PCR detection of influenza virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(3): 837-41.

Поступила 25.03.18

Принята к печати 09.04.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.2-022:579.871.11-092.7-078

Алиева А. А., Харсеева Г. Г., Мангутов Э. О., Головин С. Н.

ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ НЕДИФТЕРИЙНЫХ КОРИНЕБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ С ПАТОЛОГИЕЙ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ; 344022, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Недифтерийные коринебактерии штаммов C. pseudodiphtheriticum, несмотря на отсутствие способности продуцировать токсин, могут быть связаны с развитием воспалительных заболеваний респираторного и урогенитального тракта, кожи, гнойно-септических процессов различной локализации и др. Это свидетельствует о наличии у них факторов патогенности, помимо токсина, которые могут обуславливать адгезивную и инвазивную активность.

Цель исследования – характеристика факторов патогенности (адгезивности, инвазивности) недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных с патологией респираторного тракта.

Исследованы штаммы недифтерийных коринебактерий (n = 38), выделенные из верхних дыхательных путей от больных с хроническим тонзиллитом (C. pseudodiphtheriticum, n = 9), ангинами (C. pseudodiphtheriticum, n = 14), практически здоровых обследованных (C. Pseudodiphtheriticum, n = 15). Способность к адгезии и инвазии коринебактерий исследовали на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Her-2. Количество коринебактерий, адгезированных и инвазированных на клетках Her-2, определяли путём высева смыва на 20%-ный сывороточный агар с последующим подсчётом среднего количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл. Электронно-микроскопическое исследование адгезии и инвазии коринебактерий на культуре клеток Her-2 проводили методом трансмиссионной электронной микроскопии.

У выделенных от практически здоровых лиц штаммов C. pseudodiphtheriticum адгезивность была ниже (p ≤ 0,05), чем

Для корреспонденции: Харсеева Галина Георгиевна, д-р мед.наук, проф.; e-mail: galinagh@bk.ru

у всех исследованных штаммов недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных с патологией респираторного тракта. Наиболее выраженные адгезивные свойства ($238,3 \pm 6,5$ КОЕ/мл) обнаружены у штаммов *C. pseudodiphtheriticum*, выделенных от больных ангиной, по сравнению с таковыми, выделенными от больных хроническим тонзиллитом. Адгезивность и инвазивность у всех исследованных штаммов имели положительную коррелятивную связь. При электронно-микроскопическом исследовании видны коринебактерии, как адгезированные на поверхности клеток Hep-2 и накопившие контрастное вещество, так и инвазированные, электронно-прозрачные. Недифтерийные коринебактерии штаммов *C. pseudodiphtheriticum*, выделенных от больных с патологией респираторного тракта (ангина, хронический тонзиллит), обладали более высокой способностью к адгезии и инвазии по сравнению со штаммами *C. pseudodiphtheriticum*, изолированными от практически здоровых лиц. Выраженная способность к адгезии и инвазии, рассматриваемым как факторы патогенности *C. pseudodiphtheriticum*, позволяет им реализовывать свой патогенный потенциал, защищая от действия иммунной системы хозяина и антибактериальных препаратов.

Ключевые слова: *C. pseudodiphtheriticum*; факторы патогенности; адгезия; инвазия.

Для цитирования: Алиева А.А., Харсеева Г.Г., Мангутов Э.Е., Головин С.Н. Факторы патогенности недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных с патологией респираторного тракта. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (6): 375-378. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-375-378>

Alieva A. A., Harseeva G. G., Mangutov Je. O., Golovin S. N.

FACTORS OF PATHOGENICITY OF CORYNEBACTERIUM NON-DIPHTHERIA, ISOLATED FROM PATIENTS WITH THE PATHOLOGY OF THE RESPIRATORY TRACT

Federal State Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» Ministry of Health of Russia, 344022, Rostov-on-Don, Russian Federation

Corynebacteria non-diphtheria of *C. pseudodiphtheriticum* strains, despite the absence of the ability to produce toxin, can be associated with the development of inflammatory diseases of the respiratory and urogenital tract, skin, purulent-septic processes of various localization, etc. This indicates the presence of other pathogenicity factors, in addition to toxin, which may be adhesive and invasive activity.

Characteristics of pathogenicity factors (adhesiveness and invasiveness) of *Corynebacteria non-diphtheria* isolated from patients with pathology of the respiratory tract.

The strains of *Corynebacteria non-diphtheria* (38) isolated from the upper respiratory tract from patients with chronic tonsillitis (*C. pseudodiphtheriticum* - 9) and angina (*C. pseudodiphtheriticum* - 14 pcs.). As well as practically healthy subjects (*C. pseudodiphtheriticum* - 15 pcs.). The ability for adhesion and invasion of corynebacteria was studied on the culture of the cells of the pharyngeal epithelium Hep-2 carcinoma. The number of corynebacteria, adherent and invaded on Hep-2 cells, was determined by sowing the flush with 20% serum agar, followed by counting the average number of colony forming units (CFU) per 1 ml. Electron microscopic investigation of adhesion and invasion of corynebacteria on the culture of Hep-2 cells was carried out by transmission electron microscopy.

The adhesiveness of strains of *C. pseudodiphtheriticum* isolated from practically healthy individuals was lower ($p \leq 0,05$) than that of all the investigated strains of *Corynebacteria non-diphtheria* isolated from patients with pathology of the respiratory tract. The most pronounced adhesive properties ($238,3 \pm 6,5$ CFU/ml) were found in *C. pseudodiphtheriticum* strains isolated from patients with angina compared with those isolated from patients with chronic tonsillitis. Adhesiveness and invasiveness in all strains studied had a positive correlation. Electron microscopic examination shows corynebacteria, both adherent to the surface of Hep-2 cells and accumulated contrast medium, and invasive, electron-transparent.

Corynebacteria non-diphtheria of *C. pseudodiphtheriticum* strains isolated from patients with respiratory tract pathology (angina, chronic tonsillitis) had a higher ability to adhere and invade than *C. pseudodiphtheriticum* strains isolated from practically healthy individuals. The pronounced ability for adhesion and invasion, considered as pathogenicity factors of *C. pseudodiphtheriticum*, allows them to realize their pathogenic potential, protecting against the action of the host's immune system and antibacterial drugs.

Key words: *C. pseudodiphtheriticum*; pathogenicity factors; adhesion; invasion.

For citation: Alieva A. A., Kharseeva G. G., Mangutov Je. O., Golovin S. N. Factors of pathogenicity of *Corynebacterium non-diphtheria*, Isolated from patients with the pathology of the respiratory tract. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (6): 375-378 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-375-378>

For correspondence: Kharseeva G. G., doctor of medical sciences, professor; e-mail: galinagh@bk.ru

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 21.03.2018
Accepted 12.04.2018

Недифтерийные коринебактерии *Corynebacteria non diphtheriae* (*Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium riegeli*, *Corynebacterium striatum* и др.) являются условно-патогенными микроорганизмами – нормальными обитателями кожи и слизистых оболочек человека. Долгое время считалось, что, за исключением *Corynebacterium ulcerans* и *Corynebacterium pseudotuberculosis*, они не являются патогенными для человека. В настоящее время у нас в стране учёт частоты выделения недифтерийных коринебактерий в бактериологических лабораториях до сих пор не предусмотрен. Однако в последнее десятилетие в зарубежной литературе появились данные, свидетельствующие об их патогенности [1, 2]. Так, установлено, что 53 вида *Corynebacteria*

non diphtheriae имеют медицинское значение и могут вызывать эндокардит, септический артрит, острые заболевания верхних дыхательных путей, гнойно-септические процессы, патологию урогенитального тракта, кожи и др. [2–4]. Имеются сведения о недифтерийных коринебактериях как об агентах госпитальных инфекций, подавляющее большинство которых обладает устойчивостью к антибактериальным препаратам [2, 3]. У коринебактерий обнаружены островки патогенности, включающие ассоциированные с вирулентностью гены, ответственные за продукцию токсина и факторов адгезии [2, 3]. Учитывая, что способностью секретировать токсин обладают среди недифтерийных коринебактерий только *Corynebacterium ulcerans* и *Corynebacterium pseudotuberculosis*, для определения пато-

генных свойств этих микроорганизмов целесообразной является характеристика их адгезивности. Способность к адгезии коринебактерий связывают с поверхностными структурами бактериальной клетки и, в частности, с белками DIP0733 (или 67-72p) и DIP1281 [5, 6]. Недавно появились данные о том, что белок DIP1281, находящийся на поверхности *Corynebacterium diphtheriae*, может рассматриваться и как фактор инвазивности возбудителя дифтерии, способствующий его проникновению внутрь клеток и тканей [5, 6]. Учитывая этот факт, представляется интересным выяснить, инвазивны ли недифтерийные коринебактерии и насколько этот признак коррелирует у них с адгезивностью.

В связи с этим целью нашего исследования явилась характеристика факторов патогенности (адгезивности и инвазивности) недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных с патологией респираторного тракта.

Материал и методы. Исследованы штаммы недифтерийных коринебактерий (38 штаммов), выделенные из верхних дыхательных путей (зев, нос) от больных с хроническим тонзиллитом (*C. pseudodiphtheriticum* – 9 штаммов) и ангины (*C. pseudodiphtheriticum* – 14 штаммов) в количестве 10^5 – 10^6 КОЕ/мл и практически здоровых обследованных (*C. pseudodiphtheriticum* – 15 штаммов) в количестве 10^2 КОЕ/мл.

Способность штаммов коринебактерий к адгезии исследовали в соответствии с указаниями L. Ott на нечувствительной к токсину культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Нер-2 при экспозиции 18 ч [6]. Непосредственно перед опытом коринебактерии культивировали на кровяном агаре (рН 7,6–7,8) в течение 18 ч. Взвесь коринебактерий густотой 10^9 КОЕ/мл вносили в сывороточный бульон (рН 7,6–7,8), выдерживали в термостате (+37°C) в течение 24 ч. Готовили взвесь дифтерийных микробов в среде RPMI-1640 с добавлением 5% сыворотки эмбриональной бычьей в концентрации 10^6 КОЕ/мл и по 1 мл вносили в лунки с разреженным монослоем клеток Нер-2. Количество коринебактерий, адгезированных на клетках Нер-2, определяли путём высева смыва на 20% сывороточный агар с последующим подсчётом среднего количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл.

Для определения числа инвазивировавшихся коринебактерий в лунки планшета добавляли гентамицин в концентрации $1,2 \pm 0,4$ мг/мл с целью уничтожения коринебактерий, адгезированных на поверхности клеток Нер-2. Затем клетки Нер-2 разрушали в течение 5 мин с помощью 0,025% раствора твина-20, после чего содержимое лунок высевали на 20% сывороточный агар и подсчитывали количество КОЕ в 1 мл.

Показатели адгезии и инвазии оценивали в (КОЕ \pm m) $\times 10^2$.

Электронно-микроскопическое исследование адгезии и инвазии коринебактерий на культуре клеток Нер-2 проводили методом трансмиссионной электронной микроскопии в электронном микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Фиксацию образцов осуществляли 3,6 % раствором глутарового альдегида в фосфатном буфере (рН 7,2–7,4), постфиксацию – 2% водным раствором тетраоксида осмия (VIII). Контрастирование осуществляли по методу J.Luft и тетраоксидом осмия (VIII) [7]. Изображения получали при помощи CCD-камеры Olympus-SIS Veleta с применением программного обеспечения Olympus iTEM TEM Imaging Platform.

Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью программы STATISTICA 7.0 (StatSoftInc., США) и MedCalc (версия 9.3.5.0).

Результаты. При исследовании адгезивных свойств (см. таблицу) установлено, что у выделенных от практически здоровых обследованных штаммов *C. pseudodiphtheriticum* адгезивность была ниже ($p \leq 0,05$), чем у всех исследованных штаммов недифтерийных коринебакте-

рий, выделенных от больных с патологией респираторного тракта. Примечательно, что все исследованные штаммы недифтерийных коринебактерий токсин не продуцируют. При этом наиболее выраженные адгезивные свойства ($238,3 \pm 6,5$ КОЕ/мл) обнаружены у штаммов *C. pseudodiphtheriticum*, выделенных от больных ангины, по сравнению со штаммами *C. pseudodiphtheriticum*, выделенными от больных хроническим тонзиллитом.

При определении инвазивных свойств (см. таблицу) обнаружены такие же закономерности: среди всех исследованных недифтерийных коринебактерий наименее инвазивными оказались штаммы *C. pseudodiphtheriticum*, выделенные от практически здоровых обследованных. При этом наиболее инвазивными из числа штаммов коринебактерий, изолированных от больных с патологией респираторного тракта, оказались штаммы *C. pseudodiphtheriticum*, выделенные также от пациентов с хроническим тонзиллитом.

При сравнительном анализе интенсивности процессов адгезии и инвазии штаммов коринебактерий, выделенных от больных с патологией респираторного тракта, установлено, что адгезия превалировала ($p \leq 0,05$) над инвазией у всех исследованных штаммов. Однако различий в активности этих факторов патогенности у штаммов *C. pseudodiphtheriticum*, выделенных от практически здоровых лиц, обнаружить не удалось. Коррелятивная связь интенсивности процессов адгезии и инвазии у штаммов *C. pseudodiphtheriticum*, выделенных как от больных с хроническим тонзиллитом, так и от практически здоровых обследованных, положительна (значения R составили 0,86 и 0,93 соответственно).

При рассмотрении процессов адгезии и инвазии (рис. 1, см. обложку) с помощью электронной микроскопии (увеличение 6000) обнаружены прикрепившиеся к поверхности клеток карциномы фарингеального эпителия Нер-2 делящиеся клетки недифтерийных коринебактерий штамма *C. pseudodiphtheriticum*, выделенного от больного с хроническим тонзиллитом. На электронограмме при увеличении 20 000 (рис. 2, см. обложку) видны контуры клетки Нер-2, отростки и микроворсинки на их поверхности. Отчётливо заметны адгезированные на поверхности клеток Нер-2 коринебактерии, накопившие контрастное вещество, а также расположенные внутриклеточно, электронно-прозрачные инвазивированные клетки штамма *C. pseudodiphtheriticum*.

Обсуждение. Недифтерийные коринебактерии, несмотря на отсутствие способности продуцировать токсин, могут быть связаны с развитием воспалительных заболеваний респираторного и урогенитального тракта, кожи, гнойно-септических процессов различной локализации и др. Это свидетельствует

Адгезивные и инвазивные свойства штаммов *C. pseudodiphtheriticum*, выделенных от различных контингентов обследованных (КОЕ \pm m) $\times 10^2$

Контингент обследованных	Адгезия	Инвазия	Коэффициент корреляции (R)
Больные с патологией респираторного тракта (n = 23)			
хронический тонзиллит (n = 9)	187,0 \pm 8,5*, **	146,8 \pm 6,1*, **	0,78
ангина (n = 14)	238,3 \pm 6,5*, **	215,9 \pm 7,9*, **	0,94
Всего	212,7 \pm 3,1*, **	181,4 \pm 7,9*, **	0,86
Практически здоровые (n = 15)	104,0 \pm 4,3	92,4 \pm 7,0	0,93

Примечание. * – статистическая значимость различий ($p \leq 0,05$) между штаммами *C. pseudodiphtheriticum*, выделенными от больных с патологией респираторного тракта и практически здоровых лиц; ** – статистическая значимость различий ($p \leq 0,05$) между адгезией и инвазией.

о наличии у них иных факторов патогенности, помимо токсина, одним из которых может явиться адгезивная активность. В нашем исследовании штаммы недифтерийных коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum*), выделенные от обследованных с патологией респираторного тракта, обладали наиболее высокой степенью адгезивности по сравнению со штаммами *C. pseudodiphtheriticum*, выделенными от практически здоровых лиц, причём этот показатель коррелировал у них со способностью к инвазии. Этот факт особенно интересен, так как ранее считалось, что коринебактерии – неинвазивные микроорганизмы. Подтверждение наличия инвазивной активности у штаммов *C. pseudodiphtheriticum* представлено на электронограмме, где отчетливо видна электронно-прозрачная клетка коринебактерий, внедряющаяся в цитоплазму клеток фарингеального эпителия Her-2. Возможно, внутриклеточное расположение недифтерийных коринебактерий является одним из факторов, способствующих развитию острого воспалительного процесса в респираторном тракте. Не случайно от больных с ангинами были выделены штаммы коринебактерий с более высокой инвазивной и адгезивной активностью, чем от больных с хроническим тонзиллитом. Внутриклеточное расположение создаёт этим микроорганизмам определённые преимущества, позволяя избежать защитного действия иммунной системы организма, а также антибактериальных препаратов. На основании этого можно предположить, что для реализации патогенных свойств недифтерийным коринебактериям, не обладающим способностью продуцировать токсин, необходимы такие факторы патогенности, как адгезивность и инвазивность.

Заключение. Недифтерийные коринебактерии штаммов *C. pseudodiphtheriticum*, выделенных от больных с патологией респираторного тракта (ангина, хронический тонзиллит), обладали более высокой способностью к адгезии и инвазии по сравнению со штаммами *C. pseudodiphtheriticum*, изолированными от практически здоровых лиц. Выраженная способность к адгезии и инвазии, рассматриваемым как факторы патогенности *C. pseudodiphtheriticum*, позволяет

этим микроорганизмам, не продуцирующим токсические субстанции, реализовывать свой патогенный потенциал, защищая их от действия иммунной системы хозяина и антибактериальных препаратов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2–7 см. REFERENCES)

1. Харсеева Г.Г., Воронина Н.А.. Факторы патогенности *Corynebacterium non diphtheriae*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016; (3) 97-104.

REFERENCES

1. Kharseeva G.G., Voronina N.A. Factors of pathogenicity *Corynebacterium non diphtheriae*. Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii. 2016; (3) 97-104. (in Russian)
2. Oliveira A., Oliveira L. C., Aburjaile F. Insight of Genus *Corynebacterium*: Ascertain the Role of Pathogenic and Non-pathogenic Species. J. Frontiers in Microbiology. 2017; Article 1937.
3. Sangal V., Hoskisson P. A. Evolution, Epidemiology and diversity of *Corynebacterium diphtheriae*: new perspectives on an old foe. Infect. Genet. Evol. 2016; (43): 364–70.
4. Sangal V., Blom J., Sutcliffe I.C., Ch. von Hunolstein, Burkovski A., Hoskisson P.A.. Adherence and invasive properties of *Corynebacterium diphtheriae* strains correlates with the predicted membrane-associated and secreted proteome. BMC Genomics. 2015; 16:765.
5. Tauch A., Burkovski A. Molecular armory or niche factors: virulence determinants of *Corynebacterium* species. FEMS Microbiology Letters. 2015; 362 (23).
6. Ott L., Höller M., Rheinlaender J. Strain-specific differences in pili formation and the interaction of *Corynebacterium diphtheriae* with host cells. BMC Microbiology. 2010; 10: 257.
7. Luft J.H. Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use, and mechanism of action. The Anatomical Record. 1971; 3 (171): 369-415.

Поступила 21.03.18

Принята к печати 12.04.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 579.266.6:577.21.083

Щит И.Ю.¹, Игнатов К.Б.^{2,3}, Бикетов С.Ф.¹

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ LAMP И ПЦР-РВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ САПА И МЕЛИОИДОЗА

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, г. Оболенск;

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 117971, Москва;

³Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАН, 127422, Москва

Представлены результаты выявления ДНК штаммов *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* с помощью петлевой изотермической амплификации (LAMP) и ПЦР с детекцией продукта в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Показано, что в ПЦР-РВ праймеры надежно выявляли ДНК тех микроорганизмов, к последовательностям которых они были сконструированы. ДНК гетерологичных штаммов указанные праймеры не выявляли. При проведении LAMP ни один набор праймеров не показал высокой аналитической чувствительности и специфичности. Праймеры выявляли ДНК не всех исследованных штаммов, к генам-мишеням которых они были рассчитаны, но были способны направлять синтез фрагментов генов гетерологичных штаммов. При этом результаты повторных экспериментов плохо воспроизводились. Неудачи при проведении LAMP могут быть обусловлены наличием GC-богатых областей в гене *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* и формированием вторичных структур в изотермических условиях. В случае таких сложных для LAMP матриц, как ДНК *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei*, рекомендуется использовать ПЦР-РВ для детекции возбудителей.

Ключевые слова: петлевая изотермическая амплификация; ПЦР в режиме реального времени; *Burkholderia mallei*; *Burkholderia pseudomallei*.

Для корреспонденции: Щит Ирина Юрьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов; e-mail: shchit@obolensk.org

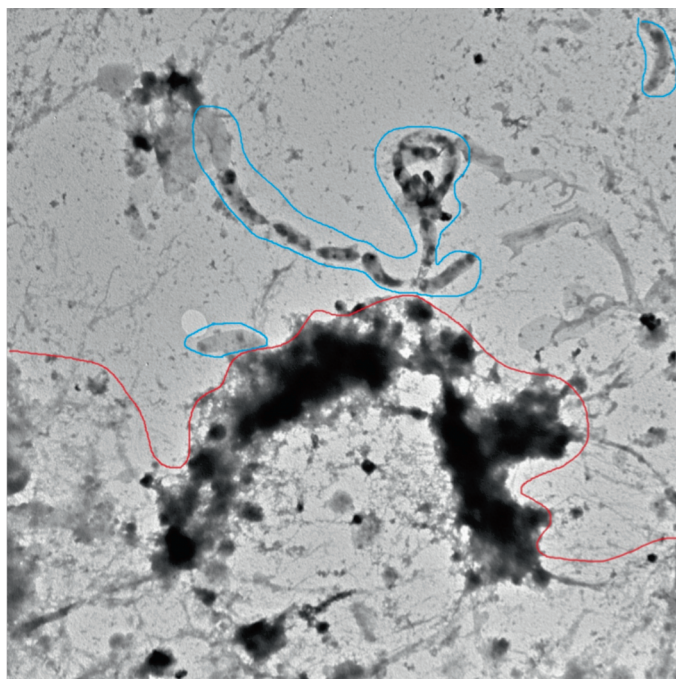


Рис.1. Клетки штамма *C. pseudodiphtheriticum*, выделенного от больного с хроническим тонзиллитом на культуре клеток Нер-2. Увеличение x 6 000. Контрастирование по методу Luft J.H. и тетраоксидом осмия (VIII) [7]. На электронограмме красным обведена цитоплазма, синим – коринебактерии.

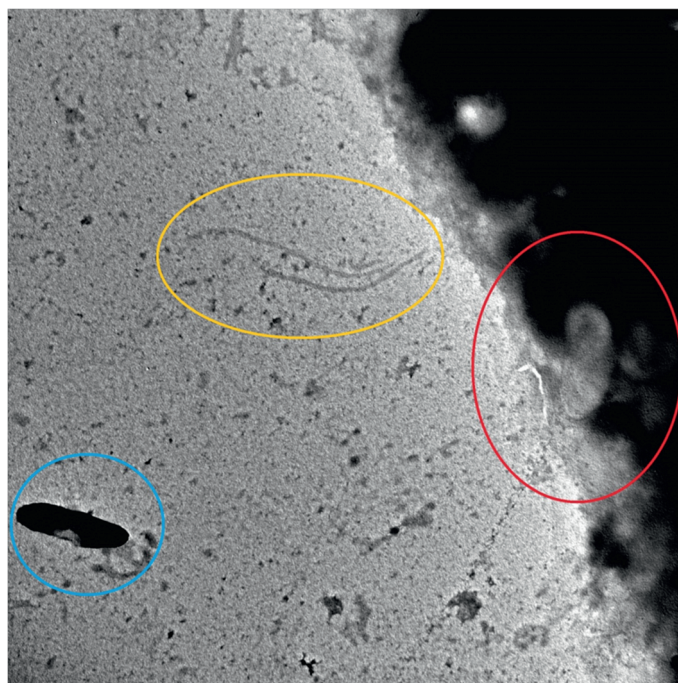


Рис. 2. Клетки штамма *C. pseudodiphtheriticum*, выделенного от больного с хроническим тонзиллитом на культуре клеток Нер-2. Увеличение x 20 000. Контрастирование по методу Luft J.H. и тетраоксидом осмия (VIII) [7].

На электронограмме контурированные микроворсинки клетки Нер-2 обведены желтым; клетка коринебактерий, внедрившаяся в цитоплазму, – красным; клетка коринебактерий, расположенная внеклеточно, - синим.