

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.152.72-06.616.941-078

Леонов В.В.<sup>1</sup>, Булатов И.А.<sup>1</sup>, Миронов А.Ю.<sup>2</sup>

## РОСТ И ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ РАЗНЫХ ВАРИАНТАХ ГОМЕОСТАЗА ЖЕЛЕЗА

<sup>1</sup>БУ «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия», 628011, Ханты-Мансийск; <sup>2</sup>ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Российская Федерация

*Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* являются приоритетными патогенами бактериемии и сепсиса. Они продуцируют широкий спектр факторов патогенности, позволяющих им размножаться и выживать в кровотоке, — гидролитические ферменты, АДФ-рибозилазные токсины, плазмокоагулазу и др. Ранее нами показано изменение активности роста и экспрессии факторов вирулентности *S. aureus* и *P. aeruginosa* при культивировании в LB-бульоне в зависимости от концентрации железа. Условия *in vivo* существенно отличаются от лабораторных. Изучена активность роста и экспрессия факторов патогенности *S. aureus* и *P. aeruginosa* при культивировании в сыворотке крови доноров с разным вариантом гомеостаза железа. Определена экспрессия генов гемолитической фосфолипазы C (*plcH*), альгината (*algD*), экзотоксина A (*exoA*) для *P. aeruginosa*, генов протеина A (*spaA*), глобального регулятора вирулентности (РНК III) для *S. aureus*. Железodefицитная сыворотка и сыворотка с нормальным гомеостазом железа снижали активность роста *S. aureus* и *P. aeruginosa*. Скорость роста и уровень экспрессии всех изученных генов оказывались выше при культивировании *S. aureus* и *P. aeruginosa* в сыворотках, содержащих избыток железа (более 30 мкМ). Культивирование *P. aeruginosa* в железodefицитной сыворотке вело к снижению уровня экспрессии генов *plcH*, *algD*, *exoA*. Экспрессия РНК III и *spaA* *S. aureus* в железodefицитной сыворотке увеличивалась по отношению к нормальному содержанию железа в крови. На примере *S. aureus* и *P. aeruginosa* показано, что экспрессия многих факторов вирулентности условно-патогенных микроорганизмов зависит от гомеостаза железа организма хозяина. А выживание и размножение микроорганизмов в крови зависят не только от иммунного статуса организма хозяина, но и от биологических свойств патогена.

**Ключевые слова:** гомеостаз железа; сыворотка; факторы патогенности; кинетика роста; железodefицитная анемия; гемохроматоз; бактериемия; сепсис; *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*.

**Для цитирования:** Леонов В.В., Булатов И.А., Миронов А.Ю. Рост и экспрессия факторов вирулентности условно-патогенных микроорганизмов в сыворотке крови при разных вариантах гомеостаза железа. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (8): 498-501. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-8-498-501

Leonov V.V.<sup>1</sup>, Bulatov I.A.<sup>1</sup>, Mironov A.Yu.<sup>2</sup>

### THE INCREASING AND EXPRESSION OF VIRULENCE FACTORS OF OPPORTUNISTIC MICROORGANISMS IN BLOOD SERUM UNDER VARIOUS ALTERNATIVES OF IRON HOMEOSTASIS

<sup>1</sup>The Khantii-Mansiiskaia state medical academy, 628011 Khantii-Mansiisk, Russia; <sup>2</sup>The G.N. Gabrichevskii Moskovskii research institute of epidemiology and microbiology of Rospotrebnadzor, 125212 Moscow, Russia

*Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* are foreground pathogens of bacteriemia and sepsis. They produce large spectrum of such factors of pathogenicity permitting them to proliferate and survive in bloodstream as hydrolytic enzymes, adenosine diphosphate-ribosylarginine toxins, plasmocoagulase, etc. The occurrence of alteration of growth and expression of virulence factors of *S.aureus* and *Paeruginosa* at fermentation in LB-broth depending on iron concentration was demonstrated previously. The conditions *in vivo* significantly differ the laboratory conditions. The activity of growth and expression of pathogenicity factors of *S.aureus* and *Paeruginosa* at fermentation in blood serum of donors with different alternative of iron homeostasis was analyzed. The study established expression of genes of hemolytic phospholipase C (*plcH*), alginate (*algD*), exotoxin A (*exoA*) for *P.aeruginosa* and genes of protein A (*spaA*), virulence global regulator (RNA III) for *S.aureus*. The iron-deficient serum and serum with normal iron homeostasis decreased activity of growth of *S.aureus* and *Paeruginosa*. The growth rate and expression level of all analyzed genes turned out higher at fermentation of *S.aureus* and *Paeruginosa* in serums containing excess of iron (more than 30 mkM). The fermentation of *Paeruginosa* in iron-deficient serum resulted in decreasing of expression level of genes *plcH*, *algD*, *exoA*. The expression of RNA III and *spaA* *S.aureus* in iron-deficient serum increased towards normal content of iron in blood. The example of *S.aureus* and *Paeruginosa* demonstrated that expression of many virulence factors of opportunistic microorganisms depends on iron homeostasis of host organism. The survival and proliferation of microorganisms in blood depend on both immune status of host organism and biological characteristics of pathogen.

**Key words:** iron homeostasis; serum; pathogenicity factors; growth kinetics; iron-deficiency anemia; hemochromatosis; bacteriemia; sepsis; *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*

**For citation:** Leonov V.V., Bulatov I.A., Mironov A.Yu. The increasing and expression of virulence factors of opportunistic microorganisms in blood serum under various alternatives of iron homeostasis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2016; 61 (8): 498-501 (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-8-498-501

**For correspondence:** Mironov A.Yu., doctor of medical sciences, professor, e-mail: andy.60@mail.ru

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

**Financing.** The study had no sponsor support

Received 05.04.2016  
Accepted 15.04.2016

**Введение.** Обобщая современные статистические данные, можно выделить по крайней мере три приоритетных патогена, играющих наиболее важную роль в этиологии сепсиса. Среди грамположительных бактерий это *Staphylococcus aureus*, среди грамотрицательных — семейство *Enterobacteriaceae* (особенно *E. coli*) и неферментирующие грамотрицательные палочки (особенно *Pseudomonas aeruginosa*). Данные патогены вызывают 80% инфекций мочевыводящих путей, 70% инфекций операционного поля, 77% инфекций кровотока, 92% нозокомиальных пневмоний [1, 2]. При любой локализации первичного очага инфекции, вызванной этими патогенами, возможна генерализация инфекционного процесса. Следуя современным взглядам на септический процесс, следует признать, что клиническая картина сепсиса не зависит от видовой принадлежности возбудителя, тогда как способность бактерий к транслокации и выживанию в крови, очевидно, связана с его биологическими свойствами. Кровь подавляет рост микроорганизмов и губительна для них, прежде всего, из-за эффекторных механизмов врожденного иммунитета и дефицита доступного для усвоения микроорганизмами железа. Однако ряд штаммов микроорганизмов обладает способностью не только выживать, но и размножаться в крови.

Существуют косвенные доказательства того, что способность бактерий выживать и размножаться в крови зависит от гомеостаза железа организма хозяина [3, 4]. Поэтому представляет интерес изучение влияния сыворотки крови, полученной от здоровых доноров и доноров с нарушениями гомеостаза железа, на биологические свойства микроорганизмов.

Цель работы — изучение активности роста и экспрессии факторов вирулентности условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) в сыворотке крови здоровых доноров и доноров с различными нарушениями гомеостаза железа.

**Материал и методы.** Исследованы клинические штаммы *S. aureus* и *P. aeruginosa*, выделенные из крови больных ОКБ Ханты-Мансийска. В качестве эталонов использованы штаммы *S. aureus* 209P и *P. aeruginosa* ATCC 27853. Для предотвращения изменения биологических свойств все штаммы хранились при + 5°C на полужидком «голодном» агаре под слоем вазелинового масла.

Кровь брали у доноров мужского пола с 0 (I) Rh(+) группой крови в возрасте от 20 до 35 лет. Кровь забирали с помощью вакуумной системы Vacutainer в пластиковые пробирки с гепарином. В крови определяли состояние параметров гомеостаза железа (содержание гемоглобина, ферритина, сывороточного железа, ОЖСС). Сыворотку получали общепринятыми методами. Использовали сыворотку доноров с нормальным гомеостазом железа, железодефицитной анемией и избытком железа, который создавался искусственно — путем

добавления 5 мкМ стерильного раствора цитрата железа.

Определение активности роста микроорганизмов осуществлялось путем посева в физиологическом растворе микробной взвеси, стандартизированной до 3 McF, в сыворотку. Посевы выращивали при 37°C с помощью прибора Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific), позволяющего контролировать турбидиметрическим методом рост микроорганизмов в автоматическом режиме ( $\lambda = 540$  нм). Скорость экспоненциального роста ( $\mu$ ) определяли по тангенсу угла наклона касательной, проведенной к начальному участку кривой роста, построенной в полулогарифмических координатах.

Для изучения влияния гомеостаза железа на экспрессию факторов патогенности *S. aureus* и *P. aeruginosa* выбраны наиболее важные для выживания в крови факторы, способствующие биопленкообразованию, — токсины и гемолитическая фосфолипаза С. В качестве гена «домашнего хозяйства» использован 16SpPHK (см. таблицу).

**Экстракция РНК, проведение ПЦР-РВ и ОТ.** Культуры *P. aeruginosa* и *S. aureus* выращивали в течение 24 ч. Выращенную суспензию клеток ( $\approx 1 \times 10^6$ — $10^7$  КОЕ) использовали для определения экспрессии генов с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с обратной транскрипцией (ОТ). Все праймеры и реагенты синтезированы ЗАО «Евроген» (Россия). Суммарную РНК выделяли с помощью набора ExtractRNA. Для синтеза первой цепи кДНК использовали около 1 нг полученной РНК. ОТ проводили набором реактивов MMLV RT kit. ПЦР-РВ проводилась с использованием  $\approx 10$  нг кДНК *P. aeruginosa* и *S. aureus*. кДНК каждого образца вносилась в лунку планшета для ПЦР, содержащую 0,2 мкМ прямого и обратного праймеров, 0,2 мМ каждого нуклеотидтрифосфата, 3 мМ  $Mg^{2+}$ , высокопроцессивную ДНК-полимеразу *Taq* со специфическими моноклональными антителами, краситель SYBR Green I, ПЦР-буфер, стерильную воду. Общий объем реакционной смеси составил 25 мкл. Для проведения процедуры амплификации использован термоциклер CFX 96 (Bio-Rad, США).

Анализ данных проводился  $\Delta$ Сt-методом с применением референс-гена, который используется для относительной количественной оценки экспрессии генов [10]. Уровень экспрессии генов выражался в условных единицах.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием *t*-критерия Стьюдента и программы Microsoft Office Excel 2003.

**Результаты и обсуждение.** Ранее показано, что культивирование УПМ в железонагруженном питательном бульоне увеличивает их вирулентность и подавляет биопленкообразование [3, 4]. Поскольку условия *in vivo* существенно отличаются от лабораторных, в данном исследовании изучалось влияние сыворот-

**Праймеры для изучения экспрессии факторов патогенности *P. aeruginosa* и *S. aureus***

Ген	Праймеры	Условия проведения реакции
16SpPHK [5]	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (прямой) 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3' (обратный)	Начальный цикл денатурации: 95°C — 3 мин; 45 циклов: 94°C — 30 с, 60°C — 1 мин, 72°C — 1 мин 30 с
Для <i>P. aeruginosa</i> :		
Экзотоксин А2 <i>exoA2</i> [6]	5'-GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC-3' (прямой) 5'-CGTGGCCCATTCGCTCCAGGGCT-3' (обратный)	Начальный цикл денатурации: 95°C — 2 мин; 30 циклов: 94°C — 30 с, 68°C — 30 с, 72°C — 30 с
Альгинат <i>algD</i> [7]	5'-AAGGCGGAAATGCCATCTCC-3' (прямой) 5'-AGGGAAGTCCGGGCGTTG-3' (обратный)	Начальный цикл денатурации: 95°C — 2 мин; 30 циклов: 94°C — 30 с, 62°C — 30 с, 72°C — 1 мин
Фосфолипаза С (гемолит.) <i>plcH</i> [8]	5'-GCACGTGGTATCCTGATGC-3' (прямой) 5'-TCCGTAGGCGTCGACGTAC-3' (обратный)	Начальный цикл денатурации: 95°C — 3 мин; 30 циклов: 94°C — 30 с, 60°C — 1 мин., 72°C — 1 мин 30 с
Для <i>S. aureus</i> :		
RNA III [9]	5'-GATGTTGTTTACGATAGCT-3' (прямой) 5'-TTCAATGGCACAAGATATC-3' (обратный)	Начальный цикл денатурации: 95°C — 5 мин; 35 циклов: 95°C — 30 с, 52°C — 30 с, 72°C — 1 мин
Протеин А <i>spaA</i> [9]	5'-AGAACAACGCAATGGTTT-3' (прямой) 5'-GGCTGTTGTGTCTCC-3' (обратный)	Начальный цикл денатурации: 95°C — 5 мин; 35 циклов: 95°C — 30 с, 52°C — 30 с, 72°C — 1 мин

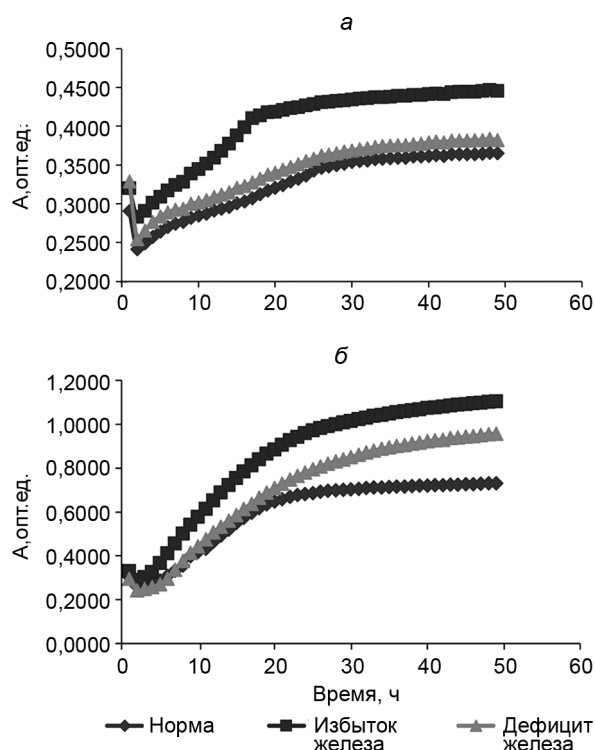


Рис. 1. Кривые роста *P. aeruginosa* 27853 ATCC (а) и *S. aureus* 209P (б) в сыворотке крови доноров с разным вариантом гомеостаза железа.

ки крови доноров на экспрессию факторов патогенности УПМ в зависимости от гомеостаза железа организма хозяина.

На первом этапе изучена активность роста штаммов *S. aureus* и *P. aeruginosa* в сыворотках доноров с разным вариантом гомеостаза железа. Использовались неинaktivированные сыворотки. Результаты представлены в виде кривых роста на рис. 1. *S. aureus* и *P. aeruginosa* в сыворотке имели все характерные для роста микроорганизмов фазы. Продолжительность лаг-фазы в сыворотке составила 1,5—2,0 ч и не отличалась от продолжительности лаг-фазы в питательном бульоне. Максимальная плотность популяции достигалась через 16—18 ч культивирования для *S. aureus* 209P. Для *P. aeruginosa* 27853 наступление стационарной фазы роста зависело от concentra-

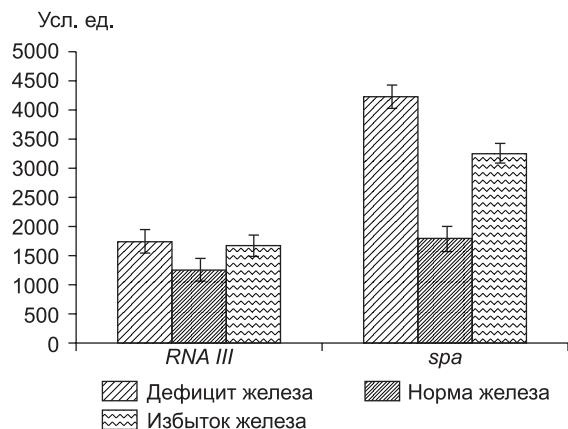


Рис. 2. Экспрессии генов вирулентности *S. aureus* 209P в сыворотке крови в зависимости от содержания в крови железа.

ции сывороточного железа — 18 ч для сыворотки с избытком железа и 24 ч для сыворотки с нормальным содержанием и дефицитом железа. Скорость роста штаммов *S. aureus* 209P и *P. aeruginosa* 27853 в сыворотке с нормальным содержанием железа составила 0,17 ч<sup>-1</sup> и 0,03 ч<sup>-1</sup> соответственно. Рост в сыворотке с избытком железа сопровождался увеличением скорости до 0,23 ч<sup>-1</sup> (*S. aureus* 209P) и 0,07 ч<sup>-1</sup> (*P. aeruginosa* 27853) по сравнению с ростом в сыворотке донора с нормальным гомеостазом железа. Скорость роста *S. aureus* 209P и *P. aeruginosa* 27853 в железodefицитной сыворотке составила 0,19 ч<sup>-1</sup> и 0,04 ч<sup>-1</sup> соответственно и была достоверно выше скорости роста в сыворотке с нормальным содержанием железа (при  $t_p = 0,95$ ), что, скорее всего, связано с ингибированием гуморальных механизмов врожденного иммунитета при железodefицитных состояниях [11].

Результаты принципиально не изменялись при использовании клинических изолятов вместо эталонных штаммов и замене донора крови. Наиболее зависимы от концентрации железа в сыворотке штаммы *P. aeruginosa*, рост которых ускорялся в 2,0—2,3 раза при культивировании в сыворотке с избытком железа. Кинетика роста в сыворотке крови зависит от варианта гомеостаза железа организма хозяина. Железодефицитная сыворотка и сыворотка с нормальным гомеостазом железа уменьшают ростовую активность всех изученных штаммов *S. aureus* и *P. aeruginosa*.

На втором этапе исследования проведено сравнительное изучение экспрессии наиболее важных факторов вирулентности *S. aureus* и *P. aeruginosa* в сыворотке в зависимости от варианта гомеостаза железа.

*S. aureus* продуцирует ряд факторов вирулентности, основные из них локализованы в хромосомном локусе *argAB-CD* [12]. Экспрессия генов данного локуса кворум-зависима и находится под контролем двухкомпонентной регуляторной системы Arg. Транскриптами генов локуса в локусе *argABCD* являются РНК II и РНК III, первая содержит основные *arg*-гены. РНК III обеспечивает регуляцию синтеза факторов вирулентности (ДНК-азы, фибринолизина, энтеротоксина,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -токсина и др.). Ген *spaA* кодирует синтез поверхностного протеина А, важного фактора адгезии и колонизации *S. aureus*, способствующего образованию биопленок. Экспрессия генов вирулентности *S. aureus* при росте в сыворотке крови представлена на рис. 2.

Культивирование *S. aureus* в железodefицитной сыворотке вело к более выраженной экспрессии факторов вирулентности: в сыворотке с нормальным содержанием железа экспрессия уменьшалась, при избытке железа снова увели-

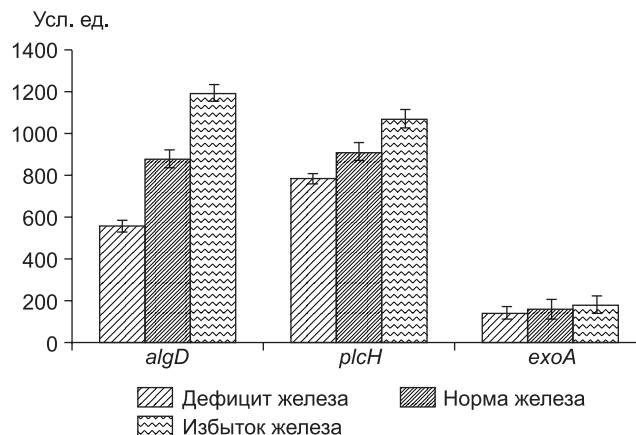


Рис. 3. Экспрессия генов вирулентности *P. aeruginosa* 27853 ATCC в сыворотке крови в зависимости от содержания в крови железа.

чивалась. Экспрессия РНК III, по отношению к нормальному содержанию железа в крови, в случае дефицита и избытка железа увеличивалась в 1,4 и 1,3 раза соответственно. Поскольку РНК III отвечает только за кворум-зависимую регуляцию экспрессии факторов патогенности, вполне логично, что подавление активности роста стафилококков в сыворотке с нормальным содержанием железа ингибирует экспрессию факторов патогенности локуса *argABCD*. Аналогичные результаты получены для экспрессии гена протеина *A spaA*. При избытке железа экспрессия гена *spaA* увеличивалась по отношению к норме в 1,8 раза, в случае дефицита железа — в 2,4 раза. Это согласуется с данными изучения экспрессии факторов вирулентности *S. aureus* в бульоне и сыворотках млекопитающих [13]. Авторы связывают увеличение экспрессии факторов вирулентности стафилококка в железodefицитных условиях с активацией стратегий получения железа.

*P. aeruginosa* обладает широким спектром факторов патогенности, экспрессия которых также кворум-зависима. Для исследования были выбраны ген продукции альгината *algD*, позволяющий косвенно судить о биопленкообразующей активности штамма, ген гемолитической фосфолипазы *C* — *plcH* и АДФ-рибозилазного экзотоксина *A2* — *exoA2*. Экспрессия генов вирулентности *P. aeruginosa* при росте в сыворотке крови представлена на рис. 3.

Сходная динамика прослеживается для всех исследованных генов. Культивирование *P. aeruginosa* в железodefицитной сыворотке вело к менее выраженной экспрессии всех факторов патогенности. В сыворотке с нормальным содержанием железа экспрессия *algD*, *plcH*, *exoA2* по отношению к уровню экспрессии с дефицитом железа увеличивалась в 1,6, 1,2 и 1,1 раза соответственно. При избытке железа экспрессия исследованных генов увеличивалась в 2,2, 1,4 и 1,3 раза соответственно по отношению к уровню экспрессии с дефицитом железа. Это свидетельствует о том, что способность *P. aeruginosa* к биопленкообразованию и гемолизу эритроцитов находится в прямой зависимости от концентрации железа в сыворотке крови.

На примере *S. aureus* и *P. aeruginosa* мы показали, что экспрессия многих факторов вирулентности УПМ зависит от гомеостаза железа организма хозяина. В норме гомеостаз железа направлен на то, чтобы ограничить способность микроорганизмов усваивать железо. Это ограничение по железу является важным механизмом регуляции вирулентности УПМ. Люди с избыточным накоплением железа, вызванным переливанием крови, интенсивной терапией солями железа или гемохроматозами, склонны к оппортунистическим инфекциям [14], часто — генерализованным.

**Заключение.** На примере *S. aureus* и *P. aeruginosa* сделана попытка объяснить важную роль гомеостаза железа организма хозяина в развитии бактериемии и сепсиса. Полученные результаты подтверждают, что выживание и размножение микроорганизмов в крови зависят не только от иммунного статуса организма хозяина, но и от биологических свойств патогена. Показано, что *S. aureus* и *P. aeruginosa* по-разному реагируют на дефицит железа. При истинной железodefицитной анемии организм в принципе не содержит железа, что не только негативно влияет на активность механизмов иммунитета, но и снижает вирулентность *P. aeruginosa*. Поэтому экспрессия факторов вирулентности *P. aeruginosa* в сыворотке крови с нормальным содержанием железа выше, чем в железodefицитной сыворотке, а в железонагруженной сыворотке имеет самые высокие значения. В аналогичных условиях сыворотка с нормальным содержанием железа подавляет активность роста *S. aureus*, а железodefицитная сыворотка и сыворотка с избыточным содержанием железа повышают активность роста и экспрессию кворум-зависимых факторов вирулентности *S. aureus*.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 5—9, 12—14)  
см. REFERENCES)

1. Козлов В.К. *Сепсис: этиология, иммунопатогенез, концепция современной иммунотерапии*. СПб.: Диалект; 2006.
2. Миронов А.Ю., Харсеева Г.Г., Клюкина Т.В. *Основы клинической микробиологии и иммунологии: учебное пособие*. Ростов-на-Дону: ГОУ ВПО РостГМУ; 2011.
3. Леонов В.В., Молчанова Т.Н. Влияние железа на ростовые характеристики условно-патогенных бактерий. *Медицинская наука и образование Урала*. 2011; 12(4): 41—3.
4. Леонов В.В., Миронов А.Ю. Биопленкообразование оппортунистических микроорганизмов плазме крови в зависимости от содержания железа. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(1): 52—4.
10. Ермилова Е.В., Залуцкая Ж.М., Лапина Т.В., Матвеева Т.В. *Количественный анализ экспрессии генов. Учебное пособие*. СПб.: ТЕССА; 2010.
11. Казакова Л.М., Гараничев В.С., Комарова М.А., Шешин В.Ю. Некоторые неспецифические факторы защиты при дефиците железа у детей. *Педиатрия. Журнал имени Г.Н. Сперанского*. 1984; (9): 31—3.

Поступила 05.04.16

REFERENCES

1. Kozlov V.K. *Sepsis: Etiologic, Immunopathogenesis, Conception Modern Immunotherapy [Sepsis: etiologiya, immunopatogenez, kontseptsiya sovremennoy immunoterapii]*. St.Petersburg: Dialekt; 2006. (in Russian)
2. Mironov A.Yu., Kharseeva G.G., Klyukina T.V. *Basics of Clinical Microbiology and Immunology: Study Guide [Osnovy klinicheskoy mikrobiologii i immunologii: uchebnoe posobie]*. Rostov-na-Donu: GOU VPO RostGMU; 2011. (in Russian)
3. Leonov V.V., Molchanova T.N. Influence of iron on the growth characteristics of opportunistic bacteria iron on the growth characteristics of opportunistic bacteria. *Meditsinskaya nauka i obrazovanie Urala*. 2011; 12(4): 41—3. (in Russian)
4. Leonov V.V., Mironov A.Yu. Biofilm formation of opportunistic microorganisms in blood plasma depending on the content of iron. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(1): 52—4. (in Russian)
5. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 1991; 173(2): 697—703.
6. Khan A.A., Cerniglia C.E. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994; 60(10): 3739—45.
7. Wozniak D.J., Ohman D.E. Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* genes *algR*, *algB* and *algD* reveals a hierarchy of alginate gene expression which is modulated by *algT*. *J. Bacteriol.* 1994; 176(19): 6007—14.
8. Wolska K., Szweida P. Genetic features of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Polish. J. Microbiol.* 2009; 58(3): 255—60.
9. Schlievert P.M., Yarwood J.M., McCormick J.K., Paustian M.L., Kapur V. Repression of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator in serum and in vivo. *J. Bacteriol.* 2002; 184(4): 1095—101.
10. Ermilova E.V., Zalutskaya Zh.M., Lapina T.V., Matveeva T.V. *Quantitative Analysis of Gene Expression. Tutorial [Kolichestvennyy analiz ekspressii genov. Uchebnoe posobie]*. St. Petersburg: TECCA; 2010. (in Russian)
11. Kazakova L.M., Garanichev V.S., Komarova M.A., Sheshin V.Yu. Some nonspecific protection factors for iron deficiency in children. *Pediatrics. Zhurnal imeni G.N. Speranskogo*. 1984; (9): 31—3. (in Russian)
12. Traber K.E., Lee E., Benson S., Corrigan R., Cantera M., Shopsin B. et al. Agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology*. 2008; 154 (Pt. 8): 2265—74.
13. Oogai Y., Matsuo M., Hashimoto M., Kato F., Sugai M., Komatsuzawa H. Expression of virulence factors by *Staphylococcus aureus* grown in serum. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(22): 8097—105.
14. Le Gall J.Y., Jouanolle A.M., Fergelot P. Genetics of hereditary iron overload. *Bull. Acad. Natl. Med.* 2004; 188(2): 247—62.

Received 05.04.16