

## МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 578.832.1.083.2

Онищенко Г.Г., Коконова М.С., Мельников Д.Г., Меркулова О.В., Писцов М.Н., Бережной А.М., Маношкин А.В., Кулиш В.С., Петров А.А., Лыков М.В., Борисевич С.В.

**ВЫДЕЛЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗОЛЯТОВ ПАНДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА ГРИППА А(H1N1)PDM09**

Центр специальной лабораторной диагностики особо опасных и экзотических инфекционных заболеваний Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзора) и Министерства обороны РФ, г. Сергиев Посад, Россия

*Представлены данные по анализу биопроб с подозрением на грипп А(H1N1)pdm09, с использованием метода обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) и секвенирования, а также выделения нативного вируса гриппа А пассированием через развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ).*

**Ключевые слова:** *грипп А(H1N1)pdm09; нуклеотидная последовательность; ОТ-ПЦР; РКЭ.*

*G.G. Onischenko, M.S. Kokonova, D.G. Melnikov, O.V. Merkulova, M.N. Pistsov, A.M. Berejnoii, A.V. Manoshkin, V.S. Kulish, A.A. Petrov, M.V. Lykov, S.V. Borisevitch*

THE SEPARATION, IDENTIFICATION AND MOLECULAR BIOLOGIC ANALYSIS OF ISOLATES OF PANDEMIC INFLUENZA VIRUS A(H1N1)PDM09

The center of specialized laboratory of diagnostic of dangerous special and exotic infectious diseases of Rospotrebnadzor and Ministry of defense of Russia, Segiev Posad, Russia

*The article presents data concerning analysis of bioassays under suspicion of influenza A(H1N1)pdm09. The technique of back transcription polymerase chain reaction and sequencing was applied. The separation of native influenza virus A was implemented using passaging through developing chick embryos.*

**Key words:** *influenza A(H1N1)pdm09; nucleotide sequence; back transcription polymerase chain reaction; developing chick embryos.*

Забайкальский край явился первым регионом Российской Федерации, где осенью 2009 г. возникла эпидемия гриппа А(H1N1)pdm09, которая сопровождалась более частым и выраженным поражением нижних дыхательных путей, способностью к развитию и быстрому прогрессированию острой дыхательной недостаточности вследствие острого респираторного дистресс-синдрома взрослых и пневмонии. Лечение больных необходимо было проводить в условиях отделения реанимации и интенсивной терапии. Особенно это касалось беременных женщин и лиц, страдающих ожирением [3–6].

В связи с быстрым распространением вируса гриппа А(H1N1)pdm09 на территории Забайкальского края стали актуальными своевременная индикация и идентификация возбудителя с помощью молекулярно-биологических и вирусологических методов анализа.

В ноябре 2009 г. из ФГУЗ “Центр гигиены и эпидемиологии в Забайкальском крае” поступили биопробы, содержащие секционный и клинический материал, взятый от заболевших и погибших людей с подозрением на грипп А(H1N1)pdm09.

Целью нашей работы явилась индикация и идентификация вируса гриппа А(H1N1)pdm09 в секционном и клиническом материале с использованием метода обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) и

секвенирования, а также выделение нативного вируса гриппа А пассированием через РКЭ.

**Материалы и методы.** Биопробы содержали клинический (прижизненные мазки из рото- и носоглотки – пробы № 16, 17) и секционный материал (кусочки трахеи, бронхов, легких – пробы № 4–15), взятый от 12 погибших людей с подозрением на грипп А(H1N1)pdm09. Четыре биопробы содержали суспензии вируса, выделенного на культуре клеток MDCK из рото- и носоглоточных смывов (пробы № 18–21) от 4 заболевших людей, один из которых впоследствии умер (рис. 1, 2).

Пулы органов (кусочки легких, бронхов, трахеи) растирали в ступках со стерильным речным песком, готовили 10% суспензии на физиологическом растворе, центрифугировали при 2,5 тыс. об/мин в течение 10 мин. Биопробы клинического материала (смывы, мазки) также разводили на физиологическом растворе 1:10.

Подготовку проб, содержащих вирус гриппа А(H1N1)pdm09, для анализа методом ОТ-ПЦР выполняли в условиях, предусматривающих работу с возбудителями опасных инфекционных заболеваний с помощью комплекта реагентов “Рибосорб” (ИнтерЛабСервис, Россия), дальнейший анализ проводился в общелабораторных условиях. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора “Reverta L-100” (ИнтерЛабСервис, Россия) в соответствии с инструкцией по применению к набору.

Для идентификации вируса гриппа А(H1N1)pdm09 использовали метод ОТ-ПЦР с использованием праймеров выбранной структуры к гену гемагглютинина подтипа N1 и гену нейраминидазы подтипа N1 с последующей электрофоретической детекцией продуктов ПЦР в 2% агарозном геле.

Для корреспонденции:

Петров Александр Анатольевич, нач. отдела

Адрес: 141306, Сергиев Посад Московской обл., ул. Октябрьская, 11  
E-mail: petrov\_a\_a@rambler.ru

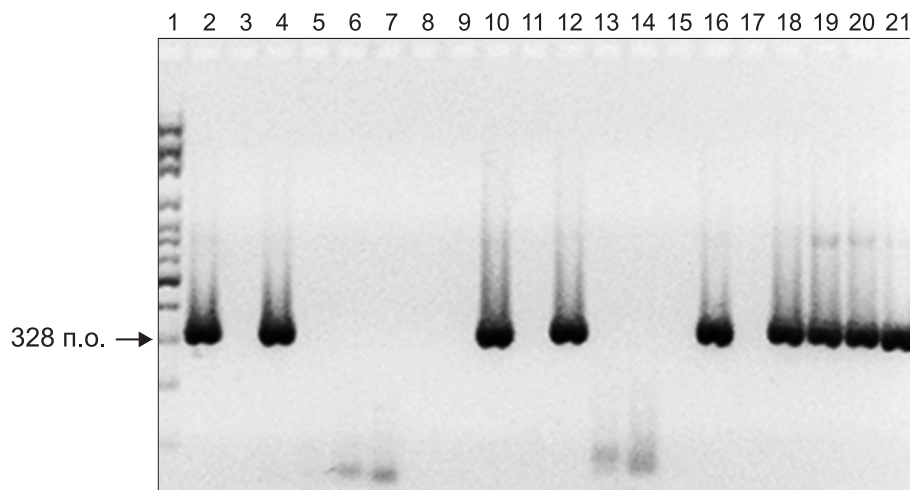


Рис. 1. Электрофореграмма результатов оценки биопроб с праймерами к гену гемагглютинаина (Н1).

1 – маркер молекулярной массы (100–3000 bp); 2 – положительный контрольный образец Н1; 3 – отрицательный контрольный образец; 4–15 – секционный материал; 16, 17 – клинический материал; 18–21 – суспензия вируса, выделенного на культуре клеток MDCK.

Секвенирование амплифицированных фрагментов проводили с использованием набора “BigDye Ready reaction kit v 1.1” согласно инструкции изготовителя (Applied Biosystems, США) с помощью автоматического капиллярного секвенатора ABI PRIZM 310 Genetic Analyzer. Для проведения сравнительного анализа секвенированных фрагментов использовали последовательности генов гемагглютинаина (Н1) и нейраминидазы (N1) различных штаммов вируса гриппа А (H1N1)pdm09, депонированных в международной базе данных GenBank. Анализ проводили с использованием модуля MegAlign из программного пакета DNASTar.

Выделение нативного вируса из биопроб проводили с использованием РКЭ 10–11-суточного возраста. В аллантоисную полость РКЭ вводили по 0,2 мл 10% вирусосодержащих суспензий. Через 48 ч с момента заражения определяли наличие вируса в аллантоисной жидкости в реакции агглютинации с 1% взвесью эритроцитов крови морской свинки.

Инфекционный титр вируса (ЭИД<sub>50</sub>·мл<sup>-1</sup>) и гемагглю-

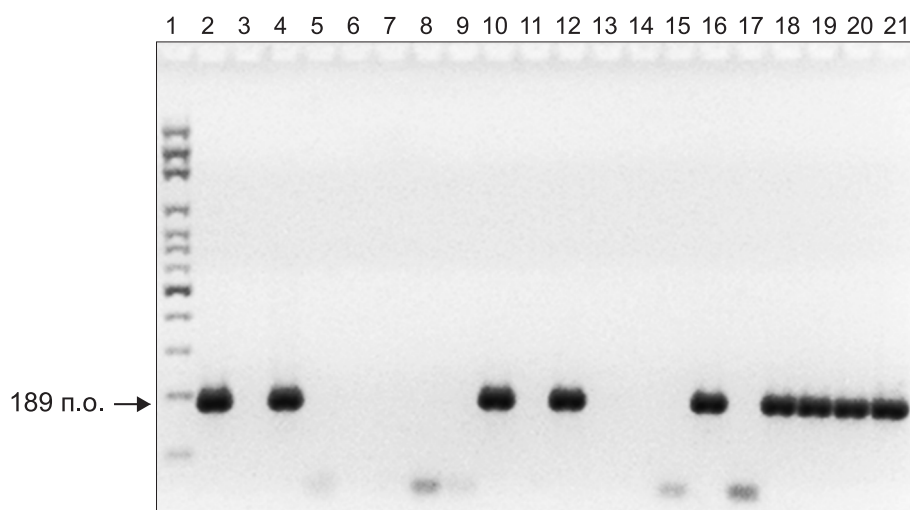


Рис. 2. Электрофореграмма результатов оценки биопроб с праймерами к гену нейраминидазы (N1).

1 – маркер молекулярной массы (100–3000 bp); 2 – положительный контрольный образец N1; 3 – отрицательный контрольный образец; 4–15 – секционный материал; 16, 17 – клинический материал; 18–21 – суспензия вируса, выделенного на культуре клеток MDCK.

тинирующую активность возбудителя определяли после двух последовательных пассажей возбудителя через РКЭ, используя на каждое разведение по 5 РКЭ.

Приготовление препаратов для электронно-микроскопического изучения вируса в аллантоисной жидкости РКЭ проводили по общепринятой методике [7]. Просмотр и фотографирование препаратов проводили с использованием электронного микроскопа G-EM-100 В при увеличении 20–40 тыс.

*Результаты и обсуждение.* При первичном анализе биопроб методом ОТ-ПЦР с использованием пар праймеров, специфичных к гену гемагглютинаина и гену нейраминидазы, с последующей электрофоретической детекцией продуктов ПЦР выявлены специфические фрагменты РНК вируса гриппа А (H1N1) в 8 биопробах, полученных из ФГУЗ “Центр гигиены и эпидемиологии в Забайкальском крае”.

На рис. 1, 2 представлены электрофореграммы результатов ОТ-ПЦР анализа полученных биопроб по генам гемагглютинаина (Н1) и нейраминидазы (N1).

В дальнейшем исследования проводились при помощи метода автоматического секвенирования. Осуществлялось выравнивание нуклеотидных последовательностей фрагментов генов гемагглютинаина и нейраминидазы, полученных в результате секвенирования, и последовательностей, депонированных в базе данных GenBank.

По результатам проведенного выравнивания были выделены участки, в которых присутствуют вставки и замены, демонстрирующие существенные отличия в нуклеотидной последовательности гена гемагглютинаина исследуемого изолята от имеющихся в базе данных.

По данным, полученным после выравнивания, можно сделать заключение об отсутствии в изучаемом фрагменте гена нейраминидазы исследуемого изолята значимых мутаций.

Сравнительный анализ секвенированных последовательностей вариабельных областей генов гемагглютинаина и нейраминидазы, амплифицированных в ПЦР, с аналогичными последовательностями штаммов A/California/04/2009 и A/California/07/2009 вируса гриппа А(H1N1)pdm09 позволил выявить гомологию с первичной структурой генов штамма A/California/04/2009.

Обогащение биопроб на РКЭ 10–11-суточного возраста с последующей постановкой реакции гемагглютинации позволило выявить нативный возбудитель в 4 биопробах, полученных из Забайкальского края (№ 18–21, см. рис. 1 и 2). Идентификация вируса методом ОТ-ПЦР показала наличие РНК вируса гриппа А(H1N1)pdm09 в обогащенных пробах.

Электронно-микроскопическое изучение вируса, содержащегося в аллантоисной жидкости РКЭ, показало, что вирионы возбудителя имеют сферическую форму диаметром 60–70 нм, а также встречаются нитевидные формы длиной 900–1500 нм и диаметром 60–70 нм, характерные для вируса гриппа. Поверхность вирионов покрыта шипиками длиной около 8–10 нм (рис. 3).

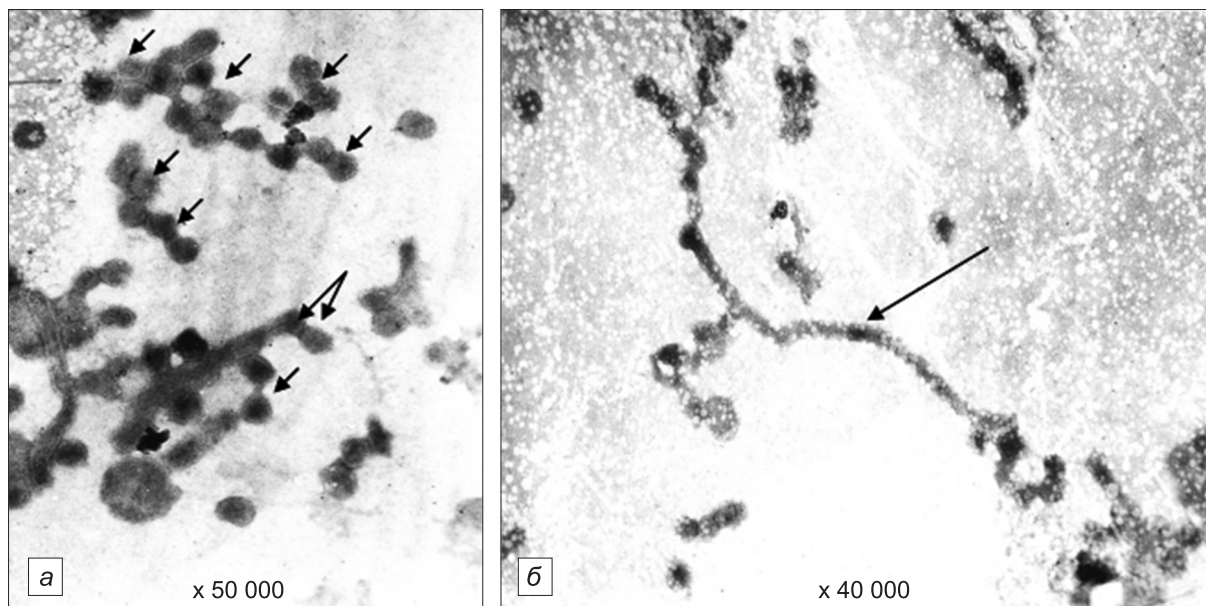


Рис. 3. Электронно-микроскопическое изучение вируса гриппа A(H1N1)pdm09.  
 а – вирионы сферической формы; б – вирионы нитевидной формы.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы [1, 2, 7].

Гемагглютинирующая активность выделенных штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 после 2-х последовательных пассажей на РКЭ составила 16–64 ГАЕ, биологическая активность возбудителя составила от 5,9 до 6,5 lg ЭИД<sub>50</sub>·мл<sup>-1</sup> (см. таблицу).

Таким образом, в результате исследований методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров, специфичных в отношении генов гемагглютинина и нейраминидазы, выявлены специфические фрагменты РНК вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в 8 биопробах, полученных из ФГУЗ “Центр гигиены и эпидемиологии в Забайкальском крае” (в трех биопробах секционного материала, одной биопробе клинического материала и четырех биопробах, содержащих суспензию вируса, выделенного на культуре клеток MDCK из рото- и носоглоточных смывов от 4 заболевших людей).

Секвенирование и дальнейший анализ полученных нуклеотидных последовательностей фрагментов генов гемагглютинина и нейраминидазы, выделенных из биопробы исследуемого изолята, свидетельствуют о том, что он является вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, который филогенетически близок к штаммам и изолятам данного возбудителя, выделенным в 2009–2010 гг. В гене гемагглютинина (позиция 253, 254 и позиция 261, 262) выявлены нуклеотидные вставки (ТС и GA), отсутствующие у ранее изученных штаммов и изолятов вируса гриппа A(H1N1)pdm09.

Инфицирование РКЭ нативным материалом с последующей постановкой реакции гемагглютинации позволило

выявить возбудитель в 4 изученных пробах. Биологическая активность выделенных штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 после двух пассажей через РКЭ составила от 5,9 до 6,5 lg ЭИД<sub>50</sub>·мл<sup>-1</sup>, гемагглютинирующая активность составила 16–64 ГАЕ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Авакян А.А., Быковский А.Ф. *Атлас анатомии и онтогенеза вирусов человека и животных*. М.: Медицина; 1970.
2. Жданов В.М., ред. *Атлас вирусной цитопатологии*. М.: Медицина; 1975.
3. Белокриницкая Т.Е., Шаповалов К.Г., Трубицина А.Ю., Романова Е.Н., Тарбаева Д.А. Клиническая характеристика гриппа A(H1N1)09 и ассоциированной с ним пневмонии у беременных. *Инфекционные болезни*. 2013; 1: 33-6.
4. Кижло Л.Б., Емельянова А.Н., Калинин Э.Н., Сергеева Э.И., Шуныева Е.В., Урбазаева А.А., Логинова Н.Ю., Веселова Е.В. Анализ вспышки высокопатогенного гриппа A(H1N1) в Забайкальском крае в 2009 г. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2011; 5: 50-2.
5. Петров А.А., Витковский Ю.А., Чарторижская Н.Н., Страмовская Н.Н., Петрова О.С. Полиморфизм генов FI, TF, FV и MTHFR у больных с летальным исходом гриппа A/H1N1 в Забайкальском крае. *Молекулярная медицина*. 2012; 2: 46-9.
6. Петров А.А., Емельянова А.Н., Чарторижская Н.Н., Витковский Ю.А. Случай тяжелого течения заболевания, вызванного штаммом вируса гриппа A/H1N1, у молодой женщины в послеродовом периоде. *Инфекционные болезни*. 2012; 2: 90-3.
7. Цизерлинг А.В., Цизерлинг В.А. *Современные инфекции. Патологическая анатомия и вопросы патогенеза*. СПб.: СОТИС; 2002.

#### Биологические характеристики выделенных штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 после двух пассажей через РКЭ

Номер биопробы	Гемагглютинирующая активность, ГАЕ	Биологическая активность, lg ЭИД <sub>50</sub> · мл <sup>-1</sup>
13	32	6,3
14	64	6,5
15	16	6,0
16	16	6,0

#### REFERENCES

1. Avakyaan A.A., Bykovskiy A.F. Atlas of anatomy and ontogeny of human and animal viruses. Moscow: Meditsina; 1970. (in Russian)
2. Zhdanova V.M., red. *Atlas viral cytopathology*. Moscow: Meditsina; 1975. (in Russian)
3. Belokrinickaya T.E., Shapovalov K.G., Trubicina A.Ju., Romanova E.N., Tarbaeva D.A. Clinical characteristics of influenza A(H1N1)09 and its associated pneumonia in pregnant women. *Infezioniomnye bolezni*. 2013; 1: 33-6. (in Russian)



4. Kizhlo L.B., Emel'yanova A.N., Kalinina Ye.N., Sergeeva Ye.I., Shunjaeva E.V., Urbazaeva A.A., Loginova N.Ju., Veselova E.V. Analysis of outbreaks of highly pathogenic influenza A (H1N1) in the Trans-Baikal region in 2009. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2011; 5: 50-2. (in Russian)
5. Petrov A.A., Vitkovskiy Ju.A., Chartorizhskaya N.N., Strambovskaya N.N., Petrova O.S. Gene polymorphism FII, TF, FV and MTHFR in patients with lethal influenza A/H1N1 in the Trans-Baikal Region. *Moleculyarnaya meditsina*. 2012; 2: 46-9. (in Russian)
6. Petrov A.A., Emel'yanova A.N., Chartorizhskaya N.N., Vitkovskiy Ju.A. A case of severe disease of young woman in the postpartum period caused by a strain of influenza A/H1N1 virus. *Infeksionnye bolezni*. 2012; 2: 90-3. (in Russian)
7. Cizerling A.V., Cizerling V.A. Modern infection. *Pathological anatomy and questions of pathogenesis*. SPb.: SOTIS; 2002. (in Russian)

Поступила 15.05.14

Received 15.05.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616-002.77-078

Малафеева Э.В., Гульнева М.Ю., Носков С.М., Романов В.А.

## ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНК УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ У БОЛЬНЫХ С РЕВМАТИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

ГБОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия» Минздрава России, 150000, Ярославль

*Проведено изучение способности к образованию биопленок у 194 штаммов условно-патогенных микроорганизмов. Установлено, что бактерии, колонизирующие организм больных с ревматическими заболеваниями (РЗ), обладают способностью к образованию микробных биопленок. Образование ими биопленок проявляется с такой же частотой, как и у возбудителей воспалительных процессов. При этом Escherichia coli, Staphylococcus haemolyticus и бактерии рода Proteus, выделенные при РЗ, обладают существенно большей способностью к биопленкообразованию, что может иметь значение в развитии коморбидных инфекций.*

**Ключевые слова:** биопленка; условно-патогенные микроорганизмы; ревматические заболевания.

E.V. Malafeeva, E.V. Gulneva, M.Yu. Noskov, V.A. Romanov

### THE FORMATION OF BIO-FILMS BY OPPORTUNISTIC MICROORGANISMS ISOLATED FROM PATIENTS WITH RHEUMATIC DISEASES

The Yaroslavl state medical academy of Minzdrav of Russia, 150000 Yaroslavl, Russia

*The study was carried out concerning capability of 194 strains of opportunistic microorganisms to form bio-films. It is established that bacteria ecizing organism of patients with rheumatic diseases have capacity to form microbial bio-films. The formation of bio-films is manifested with the same rate as in agents of inflammatory processes. At that, Escherichia coli, Staphylococcus haemolyticus and bacteria of genus Proteus isolated under rheumatic diseases have significantly higher capability to form bio-films that matters for development of comorbide infections.*

**Key words:** biofilm; opportunistic microorganisms; rheumatic diseases.

**Введение.** Формирование бактериальных биопленок представляет собой сложный процесс, включающий клеточную дифференцировку и образование сложной 3D-структуры [1]. Существование бактерий внутри биопленок обеспечивает им много преимуществ по сравнению с изолированными клетками. Бактерии в биопленках обладают повышенной защитой от действия антител, фагоцитов и противомикробных препаратов [2, 3]. Более 65% инфекционных заболеваний обусловлены микроорганизмами, существующими в составе биопленок [4].

При ревматических заболеваниях различные условно-патогенные микроорганизмы могут принимать участие в развитии иммунного воспаления [5, 6]. Клинические штаммы отличаются гетерогенностью по способности к формированию биопленок [7]. Усиленное образование биопленки не всегда наблюдается у *Staphylococcus epidermidis*, выделяемого при стафилококковой инфекции суставов [8].

Представляет интерес изучение способности к образова-

нию биопленок условно-патогенными микроорганизмами, выделенными при ревматических заболеваниях (РЗ).

**Материалы и методы.** В исследование включено 194 штамма условно-патогенных микроорганизмов, из них 77 штаммов, выделенных от больных с РЗ, и 117 клинических штаммов, изолированных у лиц группы сравнения. Исследованные штаммы получены при бактериологическом обследовании 103 больных с РЗ: 63 больных ревматоидным артритом (РА) и 40 больных остеоартритом (ОА). Диагноз РА устанавливали согласно критериям Американской ревматологической ассоциации (1987). Преобладали пациенты с I–II рентгенологической стадией (69,8%), и у 30 % больных определялась III рентгенологическая стадия поражения. Большинство пациентов (85,7%) имели II степень функциональной недостаточности суставов. Серопозитивная форма РА установлена у 88,9% больных, у остальных – серонегативная. У больных ОА преобладало поражение коленных (67,5%), у 35% – тазобедренных суставов. II рентгенологическая стадия ОА диагностирована у 65% больных, III–IV стадия у 35% больных, II функциональный класс у 25% и III функциональный класс у 75% обследованных больных. Больных обследовали бактериологическим методом, руководствуясь приказом МЗ №535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях

Для корреспонденции:

Малафеева Эльвира Васильевна, проф. каф. микробиологии  
Адрес: 150003, Ярославль, ул. Советская, 57/215  
E-mail: ch-ma@mail.ru