

Роль Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии в решении современных проблем медицинской микробиологии

И.А.Дятлов

ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация

В статье представлены материалы о Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора как научной организации, осуществляющей исследования в области медицинской микробиологии и биотехнологии с акцентом на развитие бактериологических методов выделения патогенных микроорганизмов, на широкое использование простых быстрых тестов на основе гено- и иммунодиагностики, а также высокотехнологичных аппаратных методов индикации и идентификации.

Ключевые слова: медицинская микробиология, биотехнология, технологии индикации и идентификации патогенов, борьба с лекарственной устойчивостью, создание вакцин

Для цитирования: Дятлов И.А. Роль Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии в решении современных проблем медицинской микробиологии. Бактериология. 2016; 1(1): 7–15. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-7-15

Role of the State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology in solving current problems of medical microbiology

I.A.Dyatlov

State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

The paper presents materials about the State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology (Rosпотребнадзор) as a science institution carrying out research in the field of medical microbiology and biotechnology with focus placed on improving methods to isolate pathogens as well as on wide use of simple rapid assays based on gene- and immune-diagnostics and high technology apparatus approaches to pathogen indication and identification procedures.

Key words: medical microbiology, biotechnology, pathogen indication and identification technologies, drug resistance control, vaccine design

For citation: Dyatlov I.A. Role of the State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology in solving current problems of medical microbiology. Bacteriology. 2016; 1(1): 7–15. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-7-15

Этапы становления ГНЦ ПМБ как научной организации

Всесоюзный научно-исследовательский институт прикладной микробиологии – таково первоначальное название ГНЦ ПМБ – был создан в соответствии с приказом начальника Главного управления микробиологической промышленности при Совете министров СССР 1 января 1974 г. Деятельность

института осуществлялась в соответствии с Постановлением ЦК КПСС и Совета Министров СССР «О мерах по ускоренному развитию молекулярной биологии и молекулярной генетики и использованию их достижений в народном хозяйстве». Ставилась задача в кратчайшие сроки достичь передового уровня развития молекулярной биологии, молекулярной генетики и других областей естествознания, непосредственно связанных с изучением физико-химических основ жизненных явлений.

Для корреспонденции:

Дятлов Иван Алексеевич, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: dyatlov@obolensk.org

Статья поступила 27.05.2016 г., принята к печати 15.08.2016 г.

For correspondence:

Ivan A. Dyatlov, Corresponding Member of RAS, Sc.D (Med), professor, director of State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: dyatlov@obolensk.org

The article was received 27.05.2016, accepted for publication 15.08.2016



Рис. 1. Реконструированный корпус №1 ГНЦ ПМБ, предназначенный для работы с высокопатогенными микроорганизмами при уровне защиты BSL-3 и -4.

Для работы во ВНИИ ПМ из лучших вузов и научно-исследовательских институтов отбирались выпускники и молодые ученые разных специальностей: врачи, ветеринары, физики, химики, микробиологи, биотехнологи, энтомологи. Главной задачей научного центра в то время было создание средств диагностики, лечения и защиты от особо опасных бактериальных инфекций – потенциальных компонентов биологического оружия. Параллельно институт длительное время был головной организацией по разработке микробиологических средств защиты сельскохозяйственных растений от вредителей и болезней.

До 1991 г. научные исследования и разработки велись по заданиям Главмикробиопрома и РАО «Биопрепарат». В то время институт разрабатывал методы получения новых форм микроорганизмов, проводил их лабораторную и производственную оценку, создавал и совершенствовал технологии получения биопрепаратов на основе бактерий и грибов, конструировал новые приборы для научных исследований и контроля технологических процессов. Наиболее значимыми разработками того времени стали: технология промышленного производства ревертазы (Премия Совета министров СССР), опытно-промышленные регламенты производства средств защиты растений (промышленное производство освоено на Бердском биохимическом заводе), совместная с СКБ г. Йошкар-Ола разработка и производство ЯМР-релаксометра для биотехнологического контроля (серебряная медаль ВДНХ).

В июне 1994 г. ВНИИ ПМ был присвоен статус государственного научного центра. Новое название организации – Государственный научный центр прикладной микробиологии (ГНЦ ПМ).

С 1995 г. ГНЦ ПМ сотрудничал с Международным научно-техническим центром (МНТЦ), Американским фондом гражданских исследований и развития, европейскими фондами. В результате этой работы существенно обновилась инфраструктура центра и его приборная база, остановился отток высококвалифицированных кадров, были освоены новые научные направления и методы исследований.

Распоряжением Правительства Российской Федерации от 26 сентября 2005 г. №1514-р на базе ФГУП «ГНЦ ПМ» было создано новое Федеральное бюджетное учреждение



Рис. 2. Реконструированный корпус №8 ГНЦ ПМБ, предназначенный для выпуска микробиологических питательных сред в промышленных масштабах.

науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» в составе Роспотребнадзора. Основной задачей Центра стало проведение фундаментальных и прикладных научных исследований и работ в области эпидемиологии, бактериологии и биотехнологии, направленных на обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения, включая опытно-промышленное производство биотехнологической продукции. Центр являлся координатором исследований среди научных учреждений Роспотребнадзора по федеральной целевой программе «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 годы и 2015–2020 годы)». Реализация данной программы позволила не только существенно развить научные исследования в области биологической безопасности, оснастить лаборатории современным оборудованием, но и провести масштабные реконструкции лабораторных корпусов Центра, что повысило его физическую и биологическую защищенность (рис. 1, 2).

На базе института работают Центр индикации и диагностики возбудителей опасных инфекционных болезней Роспотребнадзора для субъектов Центрального федерального округа и референс-центры по мониторингу за туляремией, клостридиозами, боррелиозом, легионеллезом, листериозом, а также Национальный центр верификации диагностической деятельности и Национальный центр, осуществляющий функции государственной коллекции.

Направления исследований ГНЦ ПМБ

Системная биология

Современная медицинская микробиология ставит своими задачами не только выявление патогенных биологических агентов (микроорганизмов и их агрессивных молекул) и разработку методов борьбы с ними, но и определение факторов, влияющих на эволюцию возбудителей инфекций, последствий деятельности человека в экосистемах, возможности прогнозирования развития эпидемиологической ситуации в различных регионах и в мире в целом. В этой связи современная эпидемиология тесно связана с развитием достаточно нового направления в науке – системной биологии. Задачами современной системной биологии явля-

ются исследование и моделирование свойств сложных биологических систем, которые нельзя объяснить суммой свойств, ее составляющих, и направлена она на интеграцию основных видов биологической информации в области геномики, транскриптомики, метаболомики, гликомики, протеомики и других данных для создания интегрированной модели клетки или микробного сообщества. Медицинская микробиология, появившаяся, в силу высокой социальной значимости, раньше других разделов микробиологии, использует в настоящее время практически все эти молекулярно-биологические подходы для решения своих задач. Оснащение лабораторий ГНЦ ПМБ и наличие современных геномных и протеомных технологий позволяют применить системный подход к исследованию взаимоотношений «патоген-хозяин» в многопараметрической системе, используя значительные вычислительные мощности и биоинформационный анализ. В настоящее время для решения подобных задач происходит накопление первичного материала о молекулярных основах вирулентности патогенов, характере иммунологического ответа на презентацию патогена в макроорганизме.

Коллекционная деятельность

Основой для микробиологической деятельности остается изолирование возбудителей, определение их основных свойств и коллекционирование. Коллекции микроорганизмов имеют своей целью сохранение фонда патогенов различными методами и его использование для решения фундаментальных научных проблем в области инфекционных болезней, создания средств диагностики и профилактики, решения задач молекулярной эпидемиологии – определения происхождения штамма. В настоящий момент разрабатывается Федеральный Закон «О национальной коллекции патогенных микроорганизмов», задачей которого является создание единого фонда зарегистрированных в федеральном реестре коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов. Реализация данного закона позволит наладить взаимодействие коллекций различных ведомств и, что самое главное, осуществлять на постоянной основе сбор и анализ штаммов со всей страны для мониторинга ситуации по их распространению, изменчивости вирулентности и устойчи-

вости. ГНЦ ПМБ, на базе которого располагается одна из Государственных коллекций патогенных микроорганизмов, участвует в создании данного ФЗ и ведет научную работу по совершенствованию коллекционной деятельности в направлениях генотипирования, секвенирования штаммов возбудителей инфекций, создания современных методологий длительного хранения фондов микроорганизмов, бактериофагов, гибридных клеточных линий, образцов ДНК, РНК, плазмид, линий эукариотических клеток. (К.б.н. А.Г.Богун – отдел коллекционных культур.)

Современные проблемы биодетекции и диагностика инфекционных поражений человека

Для решения проблем биологической безопасности, ставящей основной своей целью раннее выявление высококонтагиозных возбудителей инфекций, наибольшее значение имеет развитие индикационных процедур. Под термином «индикация патогенных биологических агентов» в настоящее время понимается комплекс специальных организационных и диагностических мероприятий, проводимых с целью подтверждения факта заражения людей патогенными биологическими агентами, направленного использования патогенов или факта их выброса при аварии на биологически опасном объекте, с определением видовой принадлежности возбудителя. Современная система индикации патогенных бактерий, простейших, грибов и вирусов базируется на использовании иммунологических, молекулярно-генетических и культуральных методов. В настоящее время усилия исследователей направлены на разработку нового поколения методов детекции, позволяющих одновременно выявлять множество различных микроорганизмов различных видов/классов, отличать живые патогены от нежизнеспособных, а также пригодных для включения в проточные системы мониторинга в реальном времени.

Культуральные методы

Без выделения культур, их всестороннего изучения и коллекционирования невозможно развитие диагностики, генетической идентификации и генотипирования. Общая схема микробиологических исследований включает в себя: отбор и

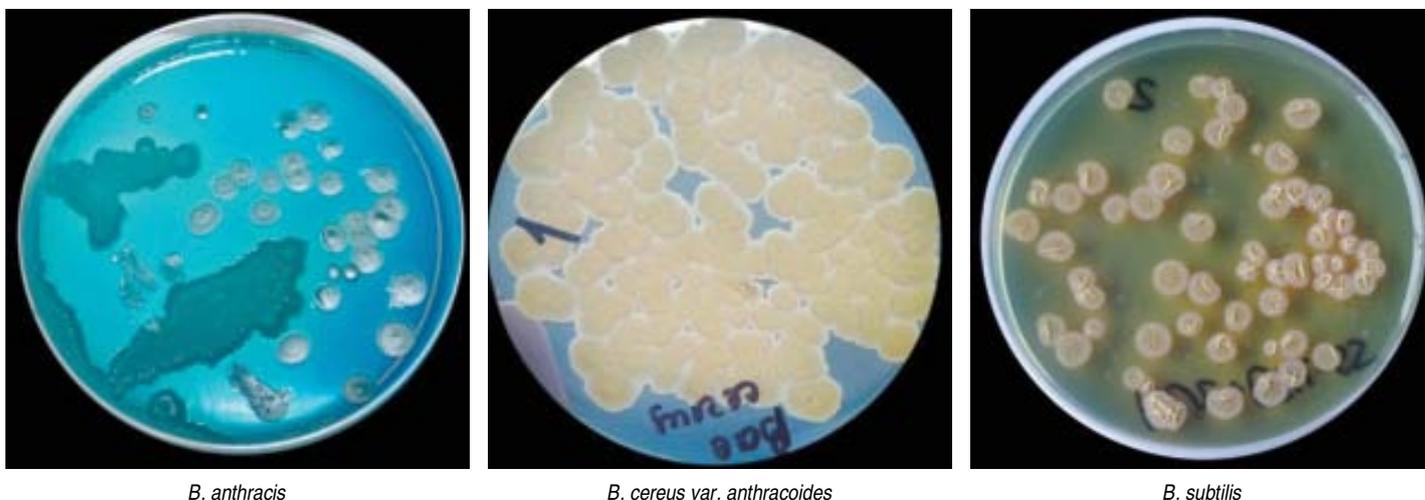


Рис. 3. Среда для дифференциации отдельных видов рода *Bacillus* по морфологии на хромогенных средах с сорбитолом, бромтимоловым синим и антибиотиками. (К.б.н. Л.И.Маринин – лаборатория сибирской язвы.)

подготовку проб, использование транспортных сред для доставки материала в Центры индикации или референс-центры, выделение патогенного агента с помощью биологической пробы или использования элективных и селективных питательных сред. Наиболее перспективными отечественными разработками являются хромогенные питательные среды и среды для выявления антибиотикорезистентности, на что направлены усилия ГНЦ ПМБ, уже выпускающего более 70 наименований сред в объеме более 120 тонн сухих сред в год и занимая более 50% рынка страны (рис. 3). (Д.б.н. А.П.Шепелин – научно-производственные подразделения Центра.)

Биологические пробы

Постановка биопроб для изолирования патогенов, вызвавших заболевания в последние годы, становится все менее востребованным методом. Практика расследования вспышек инфекционных заболеваний в России свидетель-

ствует о необходимости использования данного метода для повышения эффективности диагностической деятельности. Во многих случаях только благодаря использованию биопроб в ГНЦ ПМБ были выделены живые патогены. Для повышения эффективности метода используется снижение антибактериальной резистентности модельных животных с помощью иммуносупрессоров – стероидных гормонов, двухвалентного сернокислого железа, цитостатиков. Также используется методология нескольких путей введения подопытным животным исследуемого материала – подкожное и внутрочерепное введение, внутрибрюшинное и внутричерепное введение, внутрибрюшинное и внутрижелудочное введение. Необходим выбор адекватных модельных животных при подозрении на конкретную инфекцию. Мыши (чума, сибирская язва, туляремия, сальмонеллез, ботулизм), крысы (чума), морские свинки (сибирская язва, чума, бруцеллез, дифтерия, туберкулез, ботулизм), хомяки (сап, мелиоидоз). При выделении энтеропатогенных эшерихий до настоящего времени существует проблема с использованием биопробных животных и отсутствуют модели для изучения вакцин. Кроме того, практикуется одновременное использование нескольких видов животных для постановки биопроб, объединение образцов биоматериалов для сокращения количества используемых животных, концентрирование биоматериала на бактериальных фильтрах перед введением животным. (К.м.н. Борзилов А.И. – лаборатория биологических испытаний.)

Иммунодиагностические методы.

ИХ-тесты

Для лабораторий разного уровня, в том числе слабо оснащенных, разработаны эффективные средства диагностики – бесприборные иммуносенсоры (иммунохроматографические (ИХ) тест-системы) на основе собственных парных моноклональных антител. Основная задача внедрения таких тестов – поэтапная замена иммуносупензионных диагностикумов на более чувствительные и удобные. В ГНЦ ПМБ создана технологическая линия по выпуску ИХ-тестов, полностью на основе отечественных комплектующих. ИХ-тесты уже разработаны, зарегистрированы и выпускаются для следующих возбудителей: холерный вибрион O1 группы «Тест-полоска *V. cholerae* O1», холерный токсин «Тест-полоска *V. cholerae* tox+», легионеллы «Тест-полоска *L. pneumophila* 1», листерии «Тест-полоска *Listeria* spp.», чума – выявление антител «ИХТ-F1», чума – выявление клеток, сибирская язва – споровый антиген, сибирская язва – вегетативные клетки, туляремиальный микроб – клетки, возбудитель гриппа – выявление серотипов А, В (рис. 4). (К.м.н. С.Ф.Бикетов – отдел иммунобиохимии патогенных микроорганизмов.)

Аптамеры

Из современных, наиболее быстро развивающихся средств диагностики следует отметить аптамеры – фрагменты ДНК, специфичные к мишеням и отобранные методами высокопроизводительного скрининга *in vitro* из библиотек олигонуклеотидов. Они являются основой инновационных систем детекции патогенов, чувствительность с их использованием сравнима и превышает чувствительность методов детекции на основе антител. Эффективность отбора аптамеров не зави-

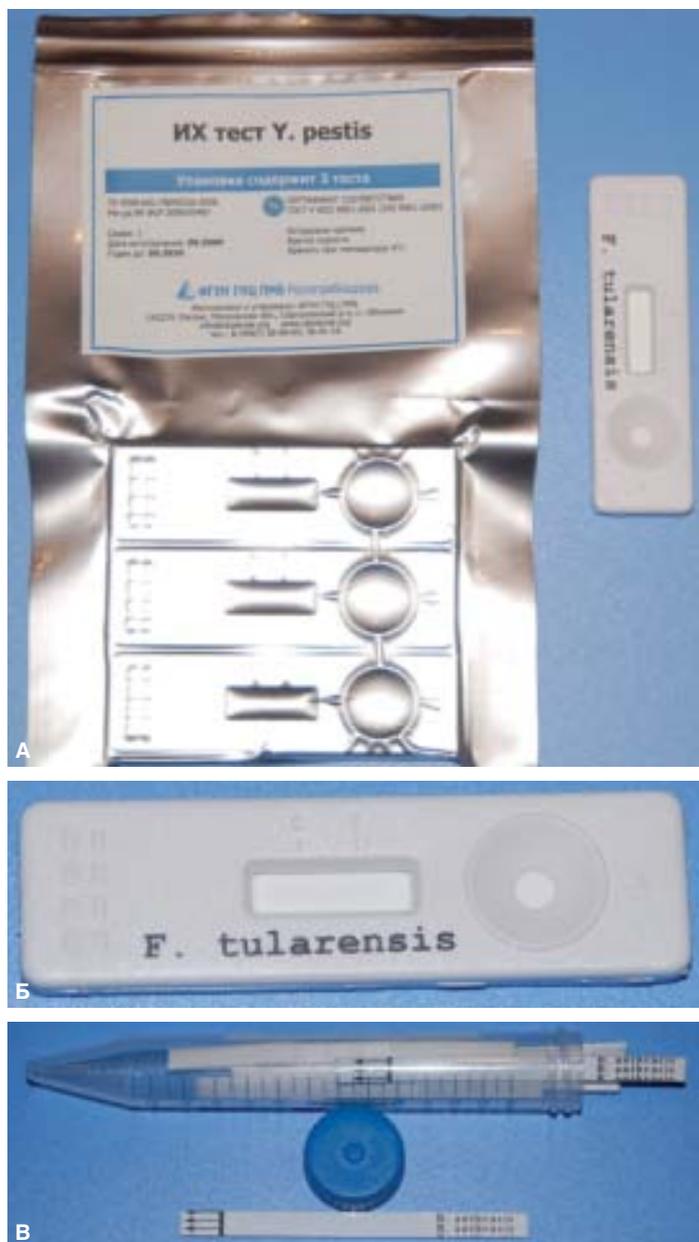


Рис. 4. Иммунохроматографические тесты. А – в блистерах; Б – в хаузенгах; В – в упаковке по 20 полосок.

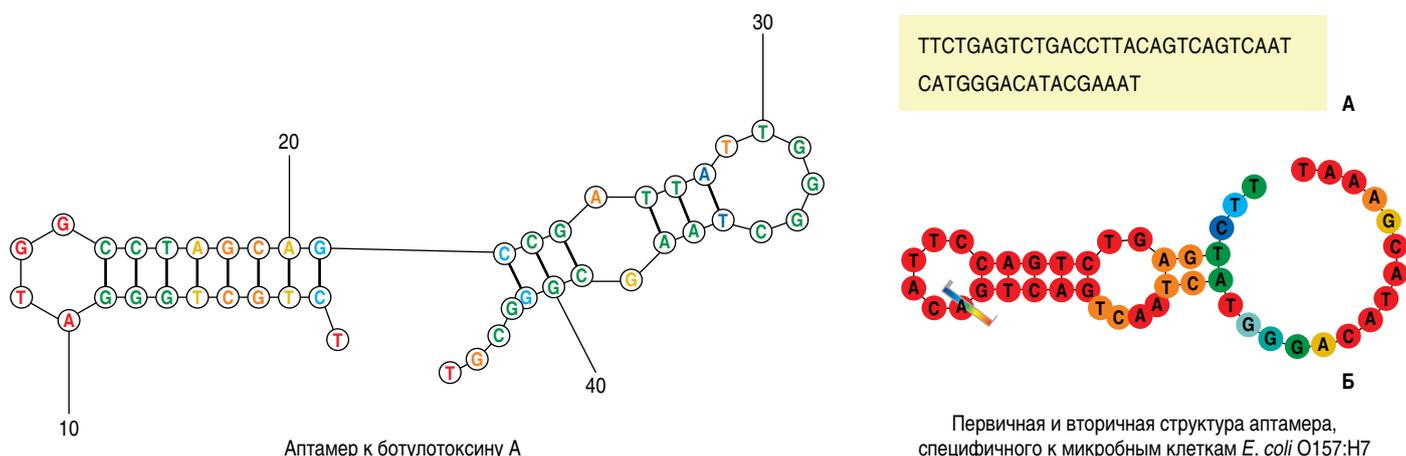


Рис. 5. Структура аптамеров, специфичных к ботулотоксину А и энтеропатогенной кишечной палочке.

сит от степени иммуногенности мишени, они могут храниться в лиофилизированном виде или в органических растворителях при комнатной температуре, легко модифицируются химически. В ФБУН ГНЦ ПМБ впервые в России получены аптамеры к патогенному штамму *E. coli* O157:H7, ботулотоксину и шига-токсину и разработаны тест-системы на их основе (рис. 5). (Д.б.н., профессор И.Г.Шемякин, к.б.н. А.В.Козырь – лаборатория молекулярной биологии.)

Генная диагностика и метагеномика.

Мультиплексные тест-системы, иммуно-ПЦР и LAMP-технология

ПЦР-реакция хорошо себя зарекомендовала при диагностических и индикационных исследованиях, однако существуют возможности повышения ее эффективности в отношении идентификации и дифференциации патогенов. Одним из таких подходов является создание мультиплексных ПЦР-тест-систем. Как примеры их эффективного использования можно назвать разработанные в ГНЦ ПМБ мультиплексные наборы для идентификации шигатоксинпродуцирующих штаммов кишечной палочки (зарегистрированы и выпускаются), тест-систему для одновременного выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии в режиме реального времени («MULTI-FLU», зарегистрирован и выпускается), систему ПЦР дифференциации подвидов *Francisella tularensis* с помощью одного праймера (таблица). (К.м.н. А.Н.Мокриевич – отдел особо опасных инфекций.)

Одним из новых современных подходов явилась разработка детекционных процедур на основе использования иммуно-ПЦР, сочетающей в себе методы ПЦР в реальном времени и ELISA. Впечатляющими являются результаты применения данного подхода: используется образец объемом 1 мкл, время реакции до 25 мин, выявляются единичные бактерии и вирусы. Для выпуска данных препаратов в ГНЦ ПМБ создана производственная база по стандартам GMP, разработаны тест-системы для определения ботулинического нейротоксина типа А («ИПЦР-BoNT/A»), летального фактора сибирской язвы («ИПЦР-ЛФ»), протективного антигена сибирской язвы («ИПЦР-ПА»), бактерий *E. coli* O157:H7 («ИПЦР- E.COLI O157:H7»), бактерий *Listeria monocytogenes* («ИПЦР-L.MONOCYTOGENES»), бактерий *Pseudomonas aeruginosa* («ИПЦР-P.AERUGINOSA»). (Д.б.н., профессор И.Г.Шемякин – лаборатория молекулярной биологии.)

Для использования в полевых условиях и, в частности, в работе Специализированных противозидемических бригад (СПЭБ) ГНЦ ПМБ вместе с противочумными институтами разработана и испытана генодиагностическая технология на основе реакции петлевой изотермической амплификации (LAMP) в сочетании с ИХ-тестами для выявления возбудителей I-II групп патогенности. К настоящему времени проведена оптимизация компонентов и условий для экспрессной бесприборной визуализации амплификатов после изотермической амплификации ДНК мишеней *Bacillus anthracis* и *Vibrio cholera*. К 2018 г. планируется регистрация тест-наборов для выявления 8 возбудителей в данной реакции. (К.м.н. С.Ф.Бикетов – отдел иммунобиохимии патогенных микроорганизмов.)

Разработки в области гено- и иммунодиагностики послужили основой для создания, совместно с Центральным институтом эпидемиологии и Государственным научным центром «Вектор», образцов биологических ДНК- и белковых чипов для выявления возбудителей ООИ, скомпонованных на основе синдромного подхода и подготовленных к госрегистрации.

Генотипирование для целей молекулярной эпидемиологии

Для дифференциации прокариот могут быть использованы как фенотипические свойства (ферментативная актив-

Таблица. Дизайн праймеров мультиплексной тест-системы для одновременного выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии в режиме реального времени – «MULTI-FLU»

Возбудитель	Мишень	Последовательность
<i>Y. pestis</i>	Yp_ypo2088_up	cga-gta-ggg-tta-ggt-ggg
	Yp_ypo2088_low	ccg-tcc-aat-gca-tgt-tag-acc-a
	Yp_ypo2088_Pr_up	(ROX)tc-cat-ttc-atg-gcg-gta-ata-tcg-gga-(RTQ2)
<i>B. anthracis</i>	sspE_up	agc-aaa-cgc-aca-ata-aga-ag
	sspE_low	acg-tct-gtt-tca-gtt-gca-aat-tct-gta-cc
	sspE_Pr_up	(FAM)ct-ggt-gct-agc-att-caa-agc-aca-aat-gct-BHQ1
<i>F. tularensis</i>	ISFtu5_up	gcc-gtg-tga-act-tta-ctt-tgg-t
	ISFtu5_low	tcc-tcg-tgt-aca-gag-cga-atc
	ISFtu5_Pr_up2	(R6G)ac-ggt-cgt-tgt-gta-aaa-atc-aac-cac-atc-(RTQ2)

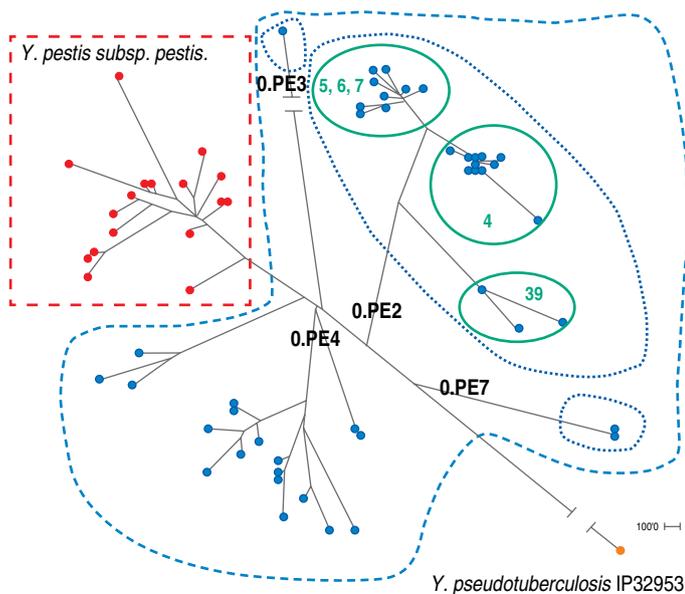


Рис. 6. Филогенетическое древо *Y. pestis* по SNP. Кластеры – *Y. pestis subsp. microtus* O.PE7, *Y. pestis subsp. microtus* O.PE2, *Y. pestis subsp. microtus* O.PE4, *Y. pestis subsp. microtus* O.PE3, *Y. pestis subsp. microtus* O.PE5 и *Y. pestis subsp. pestis*. (К.Б.Н. А.А.Кисличкина – отдел коллекционных культур.)

ность, вирулентность, профиль синтезируемых белков или жирных кислот и т.д.), так и генетическая изменчивость. Среди большого количества разработанных методов наиболее востребованными следует считать два основных подхода – полногеномное секвенирование и масс-спектрометрию. Мультилокусные методы анализа предполагают реализацию методов MLVA-типирования – кластерный анализ по tandemным повторам, DFR-типирования – кластерный анализ по отличающимся участкам ДНК, SNP-типирования на основе сиквенса. Эти методы обладают высокой дискриминационной способностью и филогенетической корректностью, дают возможность отслеживать малейшие изменения в геноме возбудителя в ходе течения эпидемической вспышки и достоверно верифицировать источник заражения.

Проводятся исследования по генотипированию на основе полногеномного секвенирования всех возбудителей особо опасных инфекций и ряда актуальных кишечных инфекций.

Проведены масштабные исследования генотипов чумного микроба для целей систематики (рис. 6). (Д.м.н., профессор А.П.Анисимов.)

Метагеномика

Одним из самых современных подходов к решению задач системной микробиологии и биодетекции стала метагеномика – раздел молекулярной генетики, изучающий метагеном, – генетический материал, получаемый напрямую из образцов среды. Если секвенирование геномов полагается на культивируемые (1% от общего числа микробов) клоны культур, то метагеномика работает с набором всех ДНК, находящихся в среде. Основным отличием при использовании метагеномного подхода является учет некультивируемых микроорганизмов наряду с культивируемыми. С начала 2015 г. ГНЦ ПМБ совместно с другими институтами ведет научные разработки в области выявления опасных инфекционных агентов в сложных биологических смесях, проводя

на первом этапе модельные метагеномные исследования с использованием ряда современных секвенаторов. Данная работа, в которой для повышения эффективности идентификации используется дополнительно магнимоносорбция и клеточный сортинг, имеет своей целью создание стандартной индикационной методологии идентификации, которая в будущем может осуществляться в режиме реального времени.

Метагеномный анализ – универсальный подход, позволяющий выявлять в образцах присутствие нуклеиновых кислот, характерных для любых микроорганизмов. Недостатком метагеномного подхода являются высокая стоимость анализа, а также сложности в проведении валидации исследования. Показано, что при проведении экспериментов возможно получение ложноположительных заключений о присутствии в образцах нуклеиновых кислот, характерных для возбудителей особо опасных инфекций [Afshinneko E. Geospatial Resolution of Human and Bacterial Diversity with City-Scale Metagenomics // Cell Systems 2015. – Vol. 1. – P. 1-15/ Hall, R.J. Beyond research: a primer for considerations on using viral metagenomics in the field and clinic. // Frontiers in Microbiology. 2015; 6:224. doi:10.3389/fmicb. 2015.00224.]. Еще одна проблема заключается в том, что в образцах, полученных от людей и животных, может содержаться большое количество нуклеиновых кислот, попавших туда из организма хозяина, что приводит к значительному снижению эффективности метагеномного анализа. В связи с этим разрабатываются алгоритмы биоинформационного анализа биологических образцов, исключающие ложноположительные заключения, а также методы проверки эффективности селективного выделения нуклеиновых кислот, относящихся к патогенным биологическим агентам. Проводится проверка эффективности методов, основанных на дифференциальном лизисе эукариотических и бактериальных клеток. В подобных методах сначала происходит лизис эукариотических клеток и удаление эукариотической ДНК. Затем осуществляется лизис бактериальных клеток и выделение бактериальных нуклеиновых кислот. В ходе выполнения работ планируется оценить эффективность подобных методик, применительно к образцам биоматериала, полученного из Республики Гвинея. Дальнейшим этапом проведения исследований будет являться метатранскриптомный анализ. В связи с тем, что геномы большого количества патогенных вирусов кодируются рибонуклеиновыми кислотами, представляется целесообразным проведение анализа тотальных препаратов РНК, выделенных из образцов. Несмотря на то, что по своей сути предлагаемый подход не направлен непосредственно на тотальное изучение транскриптов, характерных для образца, методические подходы, положенные в его основу, нашли широкое распространение в метатранскриптомных исследованиях. Серьезной проблемой, возникающей при изучении тотальной фракции РНК, выделенной из образца, является высокое содержание рибосомальной РНК. Кроме того, при выделении РНК из биологического материала, содержащего эукариотические клетки, значительное количество рибонуклеиновых кислот будут являться матричными РНК, характерными для самих клеток, а не для патогенного биологического агента. Поэтому представляется целесообразным при выделении

фракций вирусной РНК проводить этапы селективного элиминирования фракции рибосомальных и матричных РНК. Конечной целью данных исследований является разработка универсального подхода, позволяющего выявлять в образцах присутствие как ДНК, так и РНК, характерных для патогенных биологических агентов. (К.б.н. А.Г.Богун – отдел коллекционных культур.)

Проблема лекарственной устойчивости и пути ее преодоления.

Бактериофаги

Лавинообразное в последние десятилетия распространение антибиотикоустойчивых и особенно мультирезистентных штаммов патогенных бактерий привело к развитию целого ряда направлений для решения данной проблемы. Среди них – создание пробиотиков на основе бактерий-антагонистов, выделение и синтез пептидов эукариот – дефенсинов, получение бактериоцинов – низкомолекулярных катионных пептидов бактерий, использование небелковых субстанций бактерий в виде органических кислот, альдегидов, перекисей, создание новых веществ с помощью комбинаторной химии для воздействия на новую бактериальную мишень, изучение дормантных патогенов для выработки мер борьбы с некультивируемыми антибиотикочувствительными формами, появление концепции социомикробиологии, предполагающей выявление и разрыв коммуникативных связей клеток при борьбе с биопленками. В этом спектре методов борьбы с антибиотикорезистентностью бактериофаги занимают особое место в силу своих уникальных свойств как живых объектов и большого научного и клинического материала, полученного при их применении.

Основными исследовательскими задачами в данной сфере являются: создание постоянно пополняемых коллекций литических бактериофагов, активных против возбудителей бактериальных инфекций, выявление диагностических бактериофагов и их характеристика (спектр литической активности, характер взаимодействия с бактериальной клеткой, морфология, безопасность, фармакокинетика, эффективность в экспериментах на лабораторных животных), изучение геномов литических бактериофагов (секвенирование, биоинформационный анализ), филогенетический анализ, выявление, клонирование и экспрессия генов фаговых литических ферментов, изучение взаимодействия фагов с бактериальной клеткой на уровне первичных рецепторов (капсульные полисахариды), разработка препаратов бактериофагов для использования в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности.

Основой для реализации фагового направления явилась собранная в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ «Оболensk») на базе ФБУН ГНЦ ПМБ представительная коллекция бактериофагов, активных против возбудителей пищевых и госпитальных инфекций: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* серотипов *Enteritidis*, *Typhimurium*, *Infantis*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и других, а также против возбудителей особо опасных бактериальных инфекций. (Д.в.н. профессор Э.А.Светоч – отдел молекулярной микробиологии.)

Наличие охарактеризованной коллекции родственных вирулентных стафилококковых TWORD-подобных бактериофагов в ГНЦ ПМБ позволило получить, исследовать и запатентовать высоковирулентный бактериофаг SA18 с расширенным спектром активности в отношении *S. aureus*, эффективно лизирующим 100% исследованных штаммов MRSA и MSSA. Это стало возможным при исследовании биологических и генетических особенностей TWORD-подобных бактериофагов. (К.б.н. И.В.Абаев – лаборатория антимикробных препаратов.)

Некоторые из созданных уникальных бактериофагов, например, высокоспецифичный сибиреязвенный «Оболensk R-1», имеют не только высокий терапевтический потенциал, но и используется для диагностики прямыми методами и в реакции нарастания титра фага при исследовании сложных смесей, включающих в себя споры или вегетативные клетки возбудителя. (Д.м.н., профессор И.А.Дятлов.) Созданный и запатентованный ГНЦ ПМБ бактериофаг EcD4 против STEC-штамма серотипа O104:H4 обладает большим литическим спектром активности против целого ряда серовариантов *E. coli*, в том числе, наиболее распространенных высокопатогенных штаммов O157:H7. (Д.в.н. профессор Э.А.Светоч – отдел молекулярной микробиологии. К.м.н. Н.В.Воложанцев – лаборатория молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов.)

Одними из наиболее перспективных научных направлений при исследовании фагов являются работы по получению и изучению фаговых литических ферментов (эндолизин или пептидогликангидролаз), специфически лизирующих бактериальную клетку. Целый ряд эндолизин, проявляющих более широкий спектр литической активности, чем бактериофаги гены которых клонированы в ГНЦ ПМБ, и созданы соответствующие штаммы – продуценты, имеющие выраженные биотехнологические перспективы. В основном это относится к эндолизинам против *Staphylococcus aureus*, которые достаточно хорошо охарактеризованы на молекулярном уровне по двум каталитическим доменам (СНАР и амидаза) и испытаны на большом количестве штаммов. Также выполнен ряд работ по эндолизинам в отношении *Salmonella enteritidis*. Изучение механизма деполимеризации полисахаридов бактерий позволит эффективно бороться с микробными биопленками как одним из механизмов устойчивости бактерий к антибиотикам и фагам. Подобные исследования, связанные с изучением механизма деполимеризации полисахаридов бактерий специфическими бактериофагами и их ферментами, ведутся ГНЦ ПМБ в сотрудничестве с целым рядом других институтов (ИОХ РАН и ИБХ РАН). (К.м.н. Н.В.Воложанцев – лаборатория молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов. К.б.н. И.В.Абаев – лаборатория антимикробных препаратов.)

При терапевтическом использовании бактериофагов возникает ряд проблем, связанных с иммунными реакциями, быстрым высвобождением токсинов при лизисе и трудностями в определении эффективной дозы. Возможная иммунгенность фагов и их лизин может быть снижена с использованием технологий «деиммунизации» белков, заключающейся в модификации Т-клеточных эпитопов. Избежать быстрого высвобождения токсинов при лизисе можно при конструировании рекомбинантных эндолизин-дефицитных

бактериофагов, убивающих клетки, но не лизирующих их, а также при одновременном использовании холинов, перфорирующих клеточную стенку. Важным направлением исследований в этой области является конструирование рекомбинантных фагов, избирательно лизирующих только антибиотикорезистентные штаммы бактерий.

В содружестве МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского и ГНЦ ПМБ разработан и прошел государственную регистрацию специализированный продукт диетического профилактического питания «Фудфаг», используемый с целью снижения риска развития спорадических случаев и вспышек Foodborne infections, вызванных *Escherichia coli* (11 серотипов), *Salmonella enterica* (3 серотипа), *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus*. Этими же разработчиками создан коктейль бактериофагов против нозокомиальных инфекций, вызываемых лекарственно-устойчивыми штаммами *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* с клинически доказанной лечебной и профилактической эффективностью. Кроме того, в ГНЦ ПМБ получен ряд высокоспецифичных диагностических фагов – сибиреязвенный, стафилококковый, эшерихиозные.

Одним из важных направлений в данной сфере является поиск новых бета-лактамаз и их ингибиторов. Основную роль в развитии резистентности грампозитивных бактерий играют ферменты бета-лактамазы. Наибольшую опасность представляют в настоящее время металло-бета-лактамазы, имеющие атомы цинка в активном центре, из них наиболее активна NDM-1, имеется 16 вариантов этого фермента у *K. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter Iwoffii* и др. NDM-1 обладают высокой каталитической активностью и разрушают структуру всех бета-лактамных антибиотиков, быстро распространяются среди бактерий из-за плазмидной локализации генов. К настоящему времени разработан перспективный ингибитор карбпенемазы, успешно испытанный на штаммах коллекции ГНЦ ПМБ. Ведутся работы по созданию биочипов для выявления основных видов бета-лактамаз. Основная задача разработок по ингибиторам – лечение панрезистентных инфекций, использование ингибитора как компонента препаратов резерва (при биоугрозах), замена импортных препаратов на отечественные. (К.б.н. Н.К.Фурсова – лаборатория антимикробных препаратов.)

Несмотря на высокую угрозу антибиотикорезистентности в мире, эра антибиотиков еще далеко не завершилась, новые направления не дали до настоящего времени надежной замены этим лекарственным средствам, и когда они будут созданы, прогнозировать сложно. В связи с этим, наряду с новыми разработками необходима стратегия использования антибиотиков, сводящая к минимуму возможность появления резистентных штаммов. Это научные и прикладные разработки по оптимальному использованию антибактериальных агентов в медицине и производстве пищевых продуктов, создание комбинированных схем лечения и т.д. Все эти действия могут стать эффективными при разработке и реализации Национального плана по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам.

Гуманизированные антитела

Еще одним из современных подходов к лечению инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы, не поддающихся иной терапии, а также купированию токсических состояний, является получение и использование гуманизированных антител. Хорошо известны гетерологичные иммуноглобулины для лечения бешенства, энцефалита, сибирской язвы, однако они имеют ряд негативных свойств, связанных с реактогенностью. В ГНЦ ПМБ реализуется новый подход к получению таких средств, основанный на выделении у вакцинированных людей иммунокомпетентных антигенспецифических В-лимфоцитов, иммортализации вирусом Эпштейна-Барр, активации в присутствии Т-лимфоцитов, электрослиянии с гетерогридомой человек/мышь (принципиально новые клоны, появившиеся в последнее время) с помощью проточного электропоратора, селекции слитых клонов, отбора антигенспецифических клонов с помощью клеточного сортирования с дальнейшей наработкой антител и проверкой их специфичности, переклонированием экспрессионного вектора в клетки CHO. Предприняты исследования по масштабированию процессов наработки гуманизированных антител в отношении сибиреязвенного токсина и вируса клещевого энцефалита. (Д.б.н., профессор И.Г.Шемякин, к.б.н. А.В.Колесников – лаборатория молекулярной биологии.)

Разработки в области создания новых вакцин

Одним из важных направлений научных разработок ГНЦ ПМБ являются исследования по созданию новых вакцин против особо опасных инфекций, которые постепенно должны заменить традиционные живые. Разработана, прошла успешные клинические испытания чумная химическая микрокапсулированная вакцина для нужд Минобороны России на основе рекомбинантных антигенов (в стадии Госрегистрации), разработан прототип химической вакцины против шигатоксинпродуцирующих эшерихиозов, живые чумная и сибиреязвенная вакцины со сниженной реактогенностью, прототип химической туляремийной вакцины, ряд образцов ДНК вакцин и вакцин против инфекций, передающихся клещами на основе рекомбинантных белков слюны клещей. (Д.м.н. А.П.Анисимов, д.б.н. В.М.Павлов – лаборатория туляремии, к.м.н. С.Ф.Бикетов – отдел иммунобиохимии). В настоящее время большинство работ в этой сфере приостановлены в связи с тем, что из ФЦП «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2015–2020 годы)» была изъята часть, касающаяся разработки медицинских иммунобиологических препаратов. Разработан целый ряд современных методов оценки напряженности иммунитета к особо опасным инфекциям бактериальной природы, являющихся основой для определения тактики вакцинации людей против соответствующих заболеваний. (Д.б.н. В.В.Фирстова – сектор иммунологии.)

Таким образом, основными тенденциями развития современной медицинской микробиологии являются следующие. Использование методологических подходов системной биологии к исследованию взаимоотношений патогенных микроорганизмов с организмом хозяина и внешней

средой, взаимодействие системной биологии с эпидемиологией с учетом влияния экологических, социологических и эволюционных факторов. Построение филогеномных сетей на основании современных молекулярно-генетических данных, развитие новых представлений и формирование современной концепции вида у прокариот. Широкое использование средств и методов метагеномики для анализа огромного разнообразия микроорганизмов, обитающих в различных экосистемах и оказывающих разнонаправленное влияние на организм человека. Совершенствование коллекций патогенных микроорганизмов для развития проблем таксономии и геносистематики на основе полногеномного секвенирования и генотипирования. Коллекционная деятельность неразрывно связана с повышением чувствительности культуральных методов выделения возбудителей с помощью внедрения современных хромоген-

ных питательных сред и повышения эффективности метода биопроб. Развитие и широкое внедрение методов генотипирования патогенов для решения задач молекулярной эпидемиологии. Разработка и внедрение индикаторных генодиагностических методов, быстрых тестов на основе моноклональных антител, аппаратных методов масс-спектрометрического анализа, биочиповых и биосенсорных технологий, клеточного сортирования для целей изолирования, идентификации, дифференциации микроорганизмов и оценки их антибиотикорезистентности. Разработка препаратов биологического происхождения, способствующих преодолению микробной устойчивости к традиционным средствам на основе бактериофагов, их ферментов – эндוליзинов, а также гуманизированных антител для купирования токсических состояний и лечения инфекций, не поддающихся иной терапии.

Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур

ГКПМ-Оболенск

ГКПМ-Оболенск – специализированная коллекция, основными видами деятельности которой являются, сбор, хранение и изучение патогенных штаммов бактерий, а также бактериофагов, грибов и клеточных линий.

Коллекция оказывает услуги:

- депонирование (в том числе для целей национальной патентной процедуры) различных микроорганизмов;
- предоставление тестовых штаммов (тест-культур, контрольных штаммов, референс-штаммов, стандартных эталонных штаммов) предназначенных для контроля качества питательных сред;
- идентификация и изучение микроорганизмов.

Руководитель ГКПМ-Оболенск – директор ФБУН ГНЦ ПМБ, член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор Дятлов Иван Алексеевич

Подразделение, ответственное за осуществление деятельности ГКПМ-Оболенск – отдел коллекционных культур ФБУН ГНЦ ПМБ

Заведующий отделом коллекционных культур – к.б.н. Богун Александр Геннадьевич
Тел.: +7 (4967) 36-00-00

Выдача* типовых (тестовых) штаммов микроорганизмов – Галкина Елена Вячеславовна
Тел.: +7 (4967) 31-21-56

*Для получения штаммов микроорганизмов необходимо подать заявку на бланке организации-заявителя. Заявка должна быть заверена подписью руководителя организации, приобретающей штамм и печатью организации. К заявке необходимо приложить копию лицензии на право работы с патогенными биологическими агентами. Для укоренения процедуры получения штаммов ГКПМ-Оболенск рассматривает факсимильные и электронные копии документов. Заявки необходимо отправлять на факс +7 (4967) 36-00-03 или электронный адрес info@obolensk.org. В заявке желательно указать контактные данные сотрудника, заинтересованного в получении штамма.

Список услуг, предоставляемых ГКПМ-Оболенск

п/п	Наименование	Цена
1.	Выдача типовых штаммов микроорганизмов в лиофилизированном состоянии	2500 рублей за ампулу
2.	Депонирование штамма микроорганизма для целей национальной патентной процедуры	бесплатно
3.	Депонирование клеточной линии для целей национальной патентной процедуры	бесплатно
4.	Выдача депозитору образца депонированного штамма	500 рублей
5.	Идентификация микроорганизмов на системе MALDI-Biotyper:	
	1-3 культуры	1000 рублей за культуру
	4-10 культур	750 рублей за культуру
	≥11 культур	500 рублей за культуру
6.	Идентификация микроорганизмов по последовательности 16SrRNA и на системе MALDI-Biotyper:	
	1-3 культуры	7000 рублей за культуру
	4-10 культур	6000 рублей за культуру
	≥11 культур	5000 рублей за культуру
7.	Идентификация микроорганизмов на основании биохимических признаков с использованием системы микроб-автомат	по договоренности
8.	Идентификация микроорганизмов на основании биохимических признаков с использованием системы Biolog	по договоренности
9.	Идентификация микроорганизмов на основании биохимических признаков с использованием системы Vitek	по договоренности
10.	Определение метаболического профиля микроорганизма на системе Biolog	по договоренности
11.	Секвенирование генома микроорганизма на системах MiSeq и/или IonTorrent PGM (работы включают выделение ДНК микроорганизма, приготовление библиотеки, секвенирование, первичный биоинформационный анализ)	от 30 000 рублей за геном
12.	Наработка инактивированной биомассы микроорганизма	по договоренности
13.	Наработка препарата ДНК микроорганизма	по договоренности
14.	Другие исследования	по договоренности