

Федеральная служба по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ**

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЗООНОЗОВ

И.А. Дятлов

Ставрополь 2017



Источники социально-значимых зоонозов сегодня (по данным ГНЦ ПМБ)

- ❖ **Промышленная птица:** сальмонеллезы, кампилобактериоз, клостридиозы, листериоз, стафилококковая инфекция (Европа), энтерококки, эшерихиозы (редко). Источник бактерий – носителей генов антибиотикорезистентности, включая антибиотик резерва ванкомицин (статья в печати).
- ❖ **Крупный рогатый скот:** шигатоксинпродуцирующие кишечные палочки, включая серогруппы O157, O26, O55, O121, O145 и др. Нами впервые описан штамм O101:H33 совместно с O157:H7 (С-Петербург, молочная вспышка). Несколько коров в стаде могут являться источником – в прямой кишке очаг, санация стада мало эффективна (Европа). Сальмонеллезы, кампилобактер, бруцеллез, туберкулез.
- ❖ **Свиньи:** эшерихиозы, кампилобактериозы, лептоспирозы, сальмонеллезы, *Clostridium difficile* (гибель поросят в США до 50%, хосписы). Стафилококковая инфекция – распространение MRSA штаммов.
- ❖ **Овцы, козы:** эшерихиозы, листериозы.

Проводимые в ГНЦ ПМБ работы

- ❖ **Мониторинг промышленной птицы** на носительство – сальмонеллы, кампилобактеры, клостридии и листерии. В 2016 году исследован материал от птиц 50 птицефабрик 4-х Федеральных округов – Центральный, Северо-Западный, Поволжский, Южный. Антибиотикочувствительность.
- ❖ **Разработаны средства диагностики:**
 1. Латексная ТС для листерий
 2. Латексная ТС для лептиспироза
 3. Латексные ТС для определения поствакцинального иммунитета против *S. enteritidis*, *infantis*, *typhimurium* и ТС для их идентификации
 4. ПЦР ТС для идентификации эшерихиозов
 5. ТС для идентификации иерсиний энтероколита и псевдотуберкулез
- ❖ **Мониторинг кампилобактерий и клостридий:** Московская, Тульская, Курская, Белгородская, Оренбургская, ленинградская, Мордовия – 10 птицефабрик. Насители кампилобактера от 30 до 100%, клостридий 30-50%.

Разработка комплексной системы мониторинга за распространением опасных и социально значимых возбудителей

По сибиреязвенным скотомогильникам

- ❖ Разработка и создание передвижной установки для взятия проб, их анализа и последующей санации почвы.
- ❖ Создание передвижной лабораторной базы для выделения и идентификации культур возбудителя.
- ❖ Создание комплекса микробиологических и молекулярных методов выявления спор и вегетативных клеток (для полевых условий).

По мониторингу за социально-значимыми зоонозами

- ❖ Выбор модулей фильтрации воздуха, пригодных для размещения вокруг хозяйств с массовым разведением с\х животных.
- ❖ Создание методологии отбора и анализа проб с иммуносорбентами, селективными средами и системами иммунодетекции.
- ❖ Разработка технологических приемов выделения из проб почвы патогенных микроорганизмов их ускоренной идентификации.
- ❖ Разработка методических подходов для комплексного микробиологического анализа проб воздуха, воды и почвы на наличие возбудителей социально-значимых зоонозов

Структура исследований биологических образцов на присутствие патогенов



Развитие культуральных методов

Отбор и подготовка проб

Выделение патогенного агента с помощью биологической пробы

Использование транспортных сред для доставки материала в Центры Индикации и диагностики и Центры верификации

Использование элективных и селективных питательных сред для выделения возбудителя и его идентификации.



Основное направление – создание хромогенных сред для эффективной диагностики



Всего выпускается **127** медизделий, **95** зарегистрировано (**67** сухие среды, **11** – экспресс-тесты)

ГНЦ ПМБ выпускает до **130** тонн сухих сред, занимая 50% рынка в России

Хромогенные среды



Лактоза
(-)



Лактоза
(+)



АГАР
ЭНДО

E. coli



Флюорогенный агар



Pseudomonas aeruginosa

Дифференциация *Vacillus* по морфологии на хромогенных средах



Bac. anthracis



Bac. cereus
(var. *anthracoides*)



Bac. subtilis

Среда с сорбитолом, бромтимоловым синим и АБ для дифференциации и выделения *B. anthracis*



Сферы инновационных разработок в области детекции патогенов

- ❖ Полногеномное секвенирование и биоинформатика – метагеномный анализ образцов
- ❖ Мультиплексная ПЦР в реальном времени
- ❖ Мультиплексная детекция с проточной цитометрией и сортированием микрочастиц
- ❖ Иммуно-ПЦР, технологии с МКА, аптамеры вместо антител
- ❖ Флуоресцентная микроскопия высокого разрешения, в том числе конфокальная
- ❖ Масс-спектрометрия и в сочетании с мультимерными протеомными технологиями (белки патогенов)
- ❖ Тесты для экспресс-диагностики на основе МКА (латексные, иммунохроматографические)
- ❖ Биологические чипы (на основе синдромного подхода) – наиболее реальные внедрения в отечественное производство собственных ридеров.
- ❖ Петлевая изотермическая амплификации ДНК (LAMP)

Анализ тематики по созданию «Национального интеграционного центра мониторинга биологических угроз»

Создание тест-системы индикации и идентификации ПБА на основе **однодоменных антител**

Создание тест-системы индикации и идентификации ПБА на основе **панели моноклональных антител**

Создание устройства **отбора пробы воздуха** на основе циклонного коллектора

Создание прибора индикации и идентификации патогенных биологических агентов на основе спектроскопии (**романовского рассеивания, ИК-Фурье**)

Создание высокоскоростного прибора индикации возбудителей инфекционных заболеваний для экспресс-диагностики на **основе полимеразной цепной реакции** (ПЦР) с последующей гибридизацией ПЦР-продукта

Создание автоматического прибора индикации и идентификации антигенов патогенных биологических агентов в образцах воздуха на основе **планарных иммуночипов**

Создание прибора обнаружения патогенных биологических агентов в биоматериале человека (биосенсорного устройства) на основе **флуоресцентных нанокристаллов**

Создание прибора автоматической индикации и идентификации патогенных биологических агентов на основе двух независимых методов детекции (**иммунологическим методом и методом анализа нуклеиновых кислот**)

Создание прибора индикации и идентификации патогенных биологических агентов на основе **плазмонного резонанса**

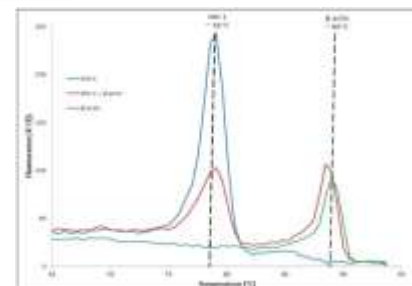
Вывод. Выполняемые разработки не находятся в русле мировых исследований в области биобезопасности и создания средств биодетекции, они или устарели или уже разработаны и используются.

Петлевая изотермическая амплификации ДНК (LAMP) для полевых условий

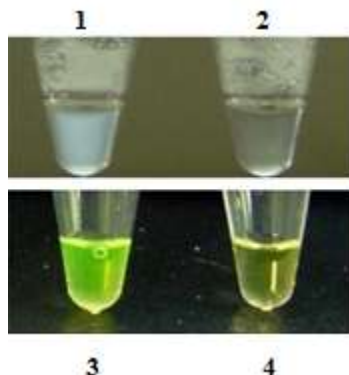
LAMP – амплификация ДНК, при постоянной температуре 60 - 65°C с замещением цепи. Выделение ДНК не нужно, не требуется амплификатор. В одной пробирке: буфер, ДНК-мишень, ДНК-полимераза, праймеры.

Синтез мишени с 2-мя или 3-мя наборами праймеров. Как правило, 4 различных праймера: F3 (прямой внешний), B3 (обратный внешний), FIP (прямой внутренний) и BIP (обратный внутренний).

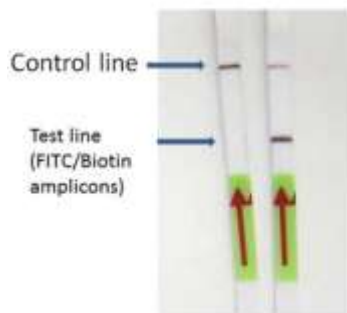
Обнаружение – электрофорез, фотометрия, визуально, ИХ-тесты, флуоресценция, в реальном времени с интеркалирующими красителями – количественно.



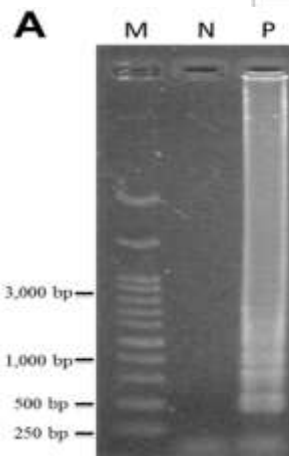
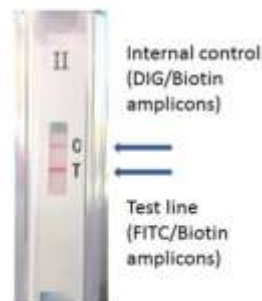
NALF detection



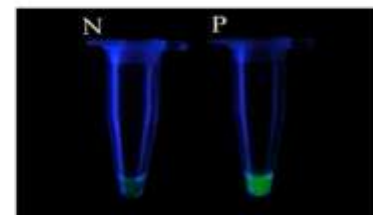
A. Milenia strips



B. Best II cassettes

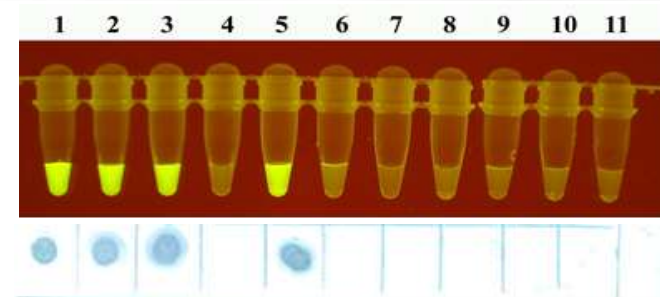
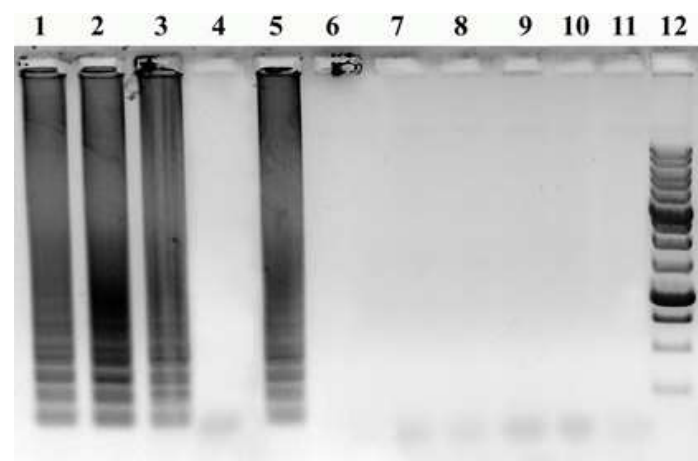
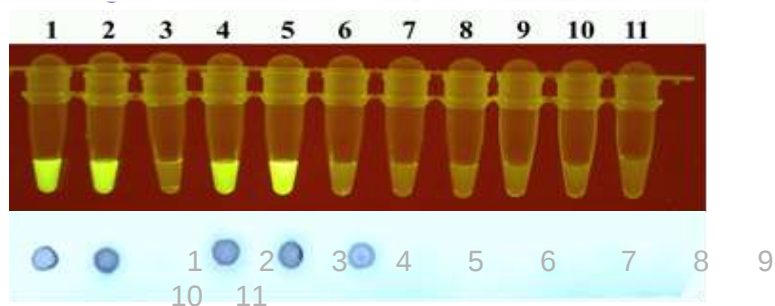
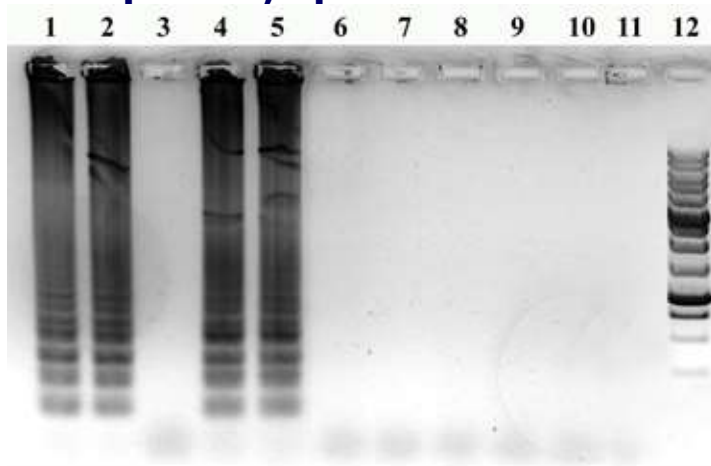


B



Выбор и оптимизация компонентов для экспрессной бесприборной визуализации результатов изотермической амплификации ДНК *B. anthracis*

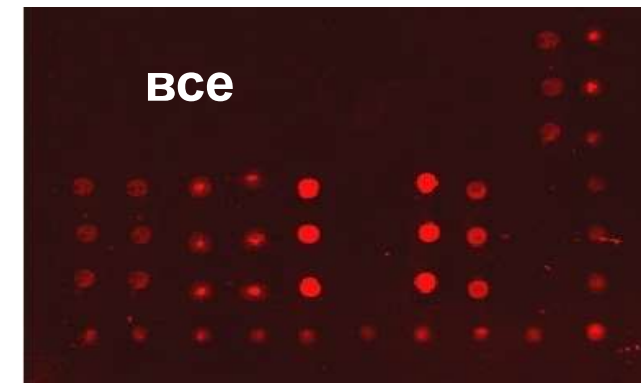
Совпадение визуализации продуктов LAMP ДНК-мишени *B. anthracis* (pXO1 и pXO2) тремя способами



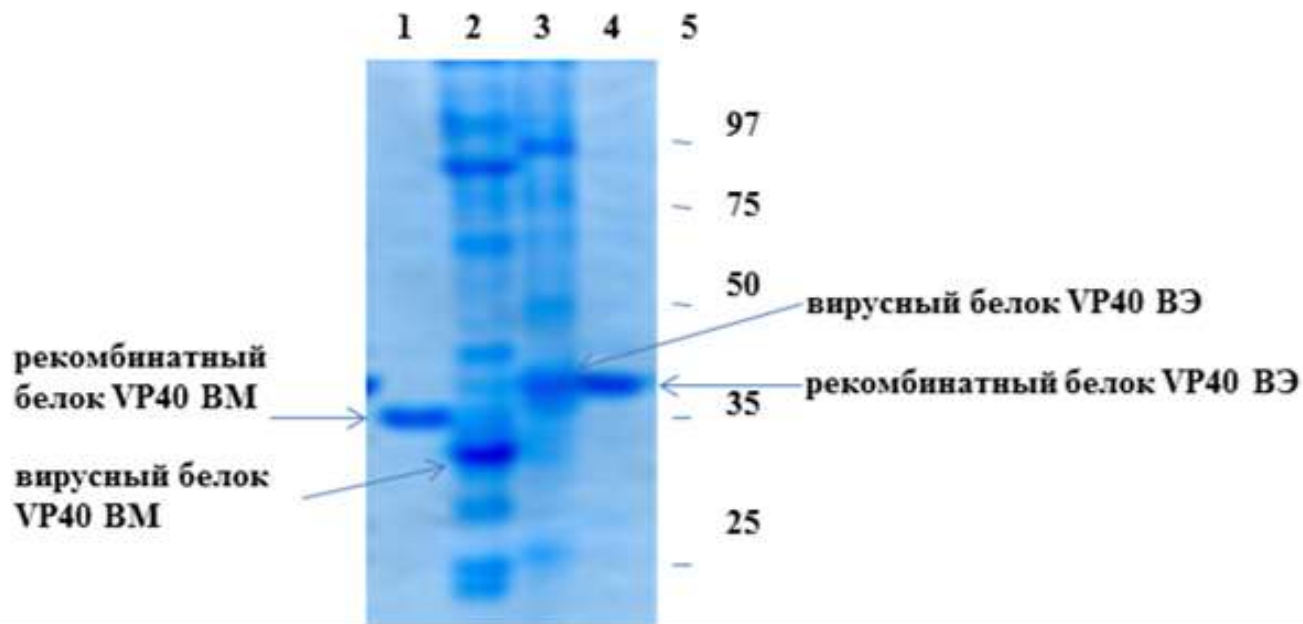
- а – визуализация с помощью электрофореза, - **120 минут**
- б – визуализация с помощью окрашивания **SYBR Green**, - **60 минут**
- в – визуализация с помощью дот-блота – **90 минут**

Разработка компонентов и конструирование ДНК-биочипа на основе синдромного подхода.

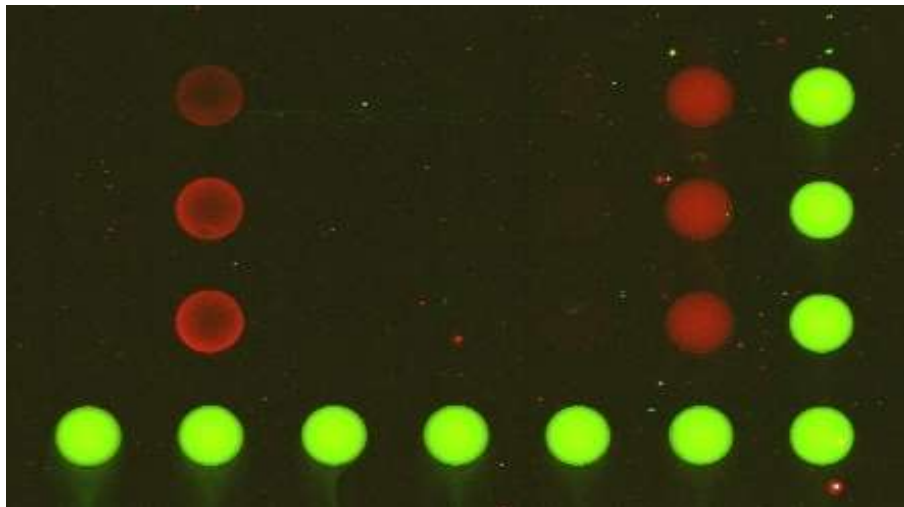
Испытания ДНК-биочипов ЛИХОРАДКИ, для одновременной идентификации возбудителей туляремии, чумы, сибирской язвы, гриппа А, лихорадок Эбола, Марбург, Ласса, Хунин и Мачупо



Белковый биочип на основе антител к рекомбинантному антигену вируса Эбола-VP40



ГНЦ ВБ «Вектор»

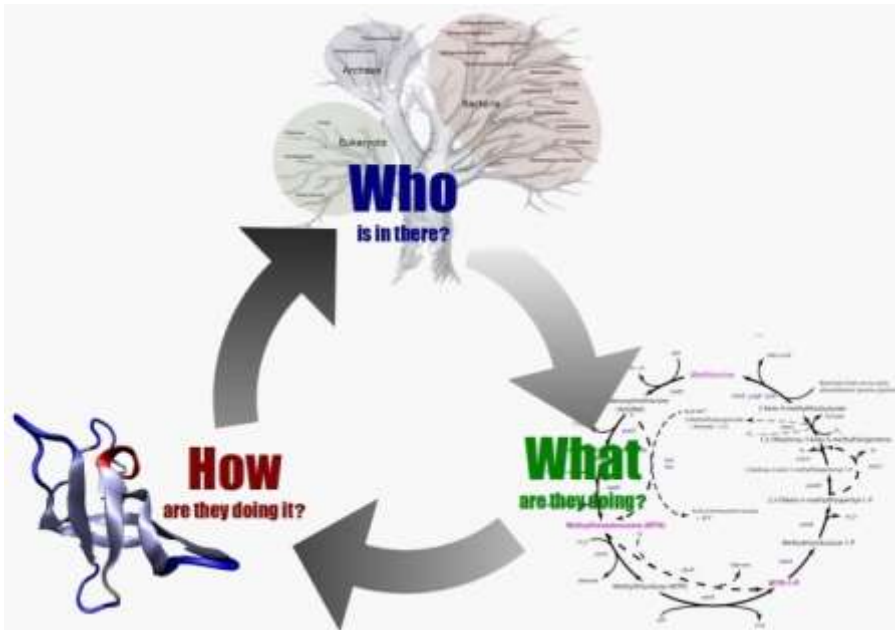


Флуоресцентный профиль
белкового биочипа при наличии в
образце антигенов возбудителя
лихорадки Эбола (второй ряд
слева) и гриппа (второй ряд
справа) По периметру справа и
внизу- зеленые границы биочипа

Метагеномика



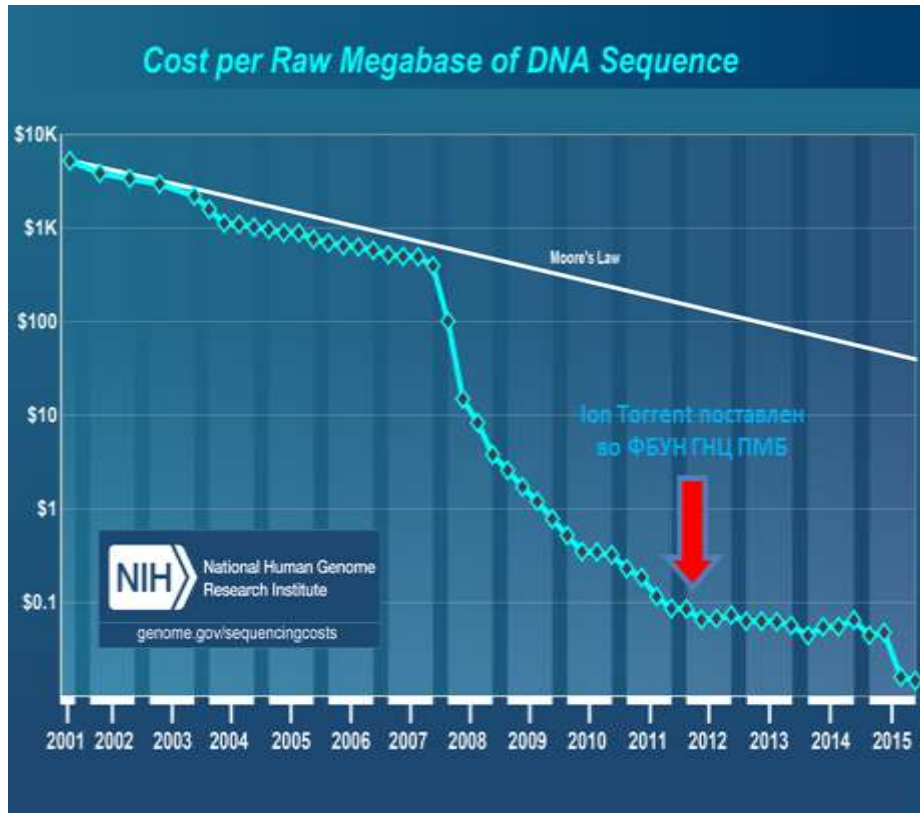
- ❖ «**Метагеном**» - генетический материал, получаемый напрямую из образцов.
- ❖ Секвенирование геномов полагается на культивируемые (1 % от общего числа микробов) клоны культур.
- ❖ Метагеномика работает с набором всех ДНК находящихся в среде.
- ❖ Метагеномного подход позволяет учитывать **некультивируемые микроорганизмы наряду с культивируемыми**.



- В ближайшие годы станет основным методом идентификации и генотипирования
- идентификации патогенов одновременно с их молекулярно-генетической характеристикой (факторы вирулентности, антибиотикорезистентность);
- возможность идентифицировать редкие и новые патогены.



Стоимость исследований по данным NHGRI



2001-2007 год - снижение стоимости анализа по Сенгеру
2007 – 2012 выход на рынок нескольких эффективных платформ (HiSeq, Ion Torrent, SOLID, MiSeq)

2012-2015 незначительное снижение стоимости (с 0,1\$ до 0,05\$)

2015- трехкратное снижение стоимости (с 0,05\$ до 0,014\$)

HiSeq X Ten это 10 машин HiSeq X
20 000 000 \$ в США

Купить 1 нельзя !!!

1000 \$ США за геном человека с покрытием 30X

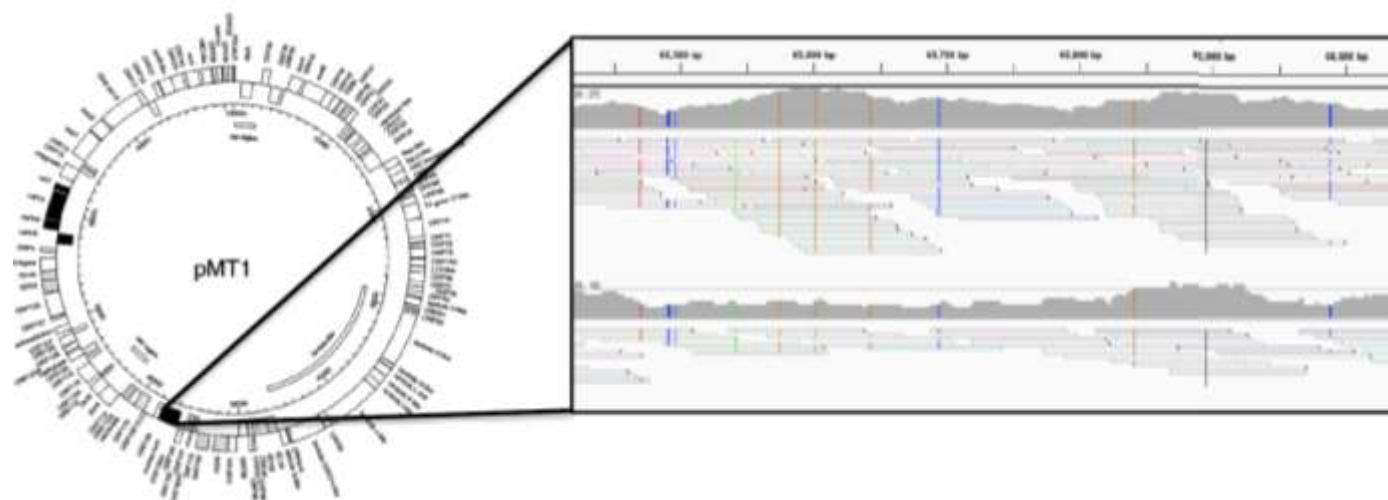
Возможности метагеномики для биодетекции в реальном времени

Potential Infectious Agents & Toxins

Genus and species	No. Reads (MegaBLAST)	MetaPhlAn abundance	No. Samples	Database
<i>Bacillus anthracis</i>	10,048	0.19	2	CDC
<i>Clostridium perfringens</i>	89,720	0.16	10	PATRIC
<i>Clostridium tetani</i>	61,718	0.17	9	PATRIC
<i>Escherichia coli</i>	3,484,839	5.69	68	PATRIC
<i>Shigella sonnei</i>	27,163	0.07	3	PATRIC
<i>Staphylococcus aureus</i>	648,471	1.09	65	CDC
<i>Yersinia pestis</i>	36,236	0.01	3	CDC

В метро Нью-Йорка -
ДНК возбудителей чумы,
сибирской язвы и других
возбудителей

2015 год журнал Cell
Systems



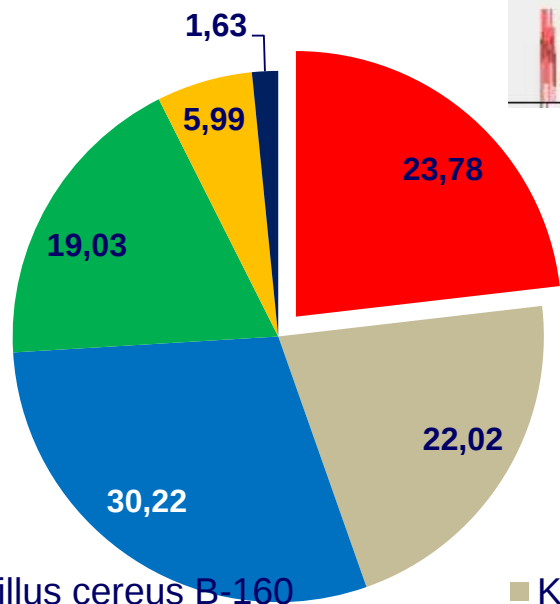
по данным секвенирования выявлена плазида чумного микроба,
однако, детальный анализ ридов позволяет обнаружить ошибки

Результаты по метагеномным разработкам

ГНЦ ПМБ, Вектор, НИИЭМ Пастера, НИИЭМ Блохиной, Ставропольский, Ростовский ПЧИ

1. Созданы базы данных, включающей характерные варианты последовательностей ДНК *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* и *Vibrio cholerae* (**не менее 95% идентичности**)
2. Разработан алгоритм анализа метагеномных данных, позволяющего выявлять в сложных образцах присутствие ДНК *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* и *Vibrio cholerae* (**биоинформационный анализ**)
3. Разработана и дана оценка эффективности модельной системы, для выявления в сложных образцах *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* и *Vibrio cholerae* в низкой концентрации, что позволило осуществлять их дифференциацию с близкородственными микроорганизмами
4. Отработана технологии анализа сложных смесей, содержащих нуклеиновые кислоты представителей сообщества патогенов – возбудителей инфекций II-IV групп патогенности (**возбудители холеры и эшерихиозов, стафилококки, листерии, клостридии, сальмонеллы, патогенные вирусы**)

Дифференциация с близкородственными штаммами



■ *Bacillus cereus* B-160

■ *Escherichia coli* B-2393

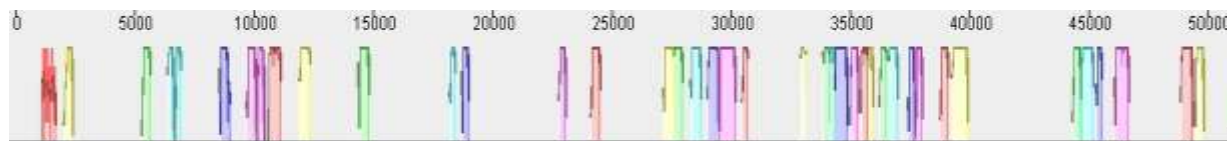
■ *Clostridium perfringens* B-6433

■ *Klebsiella pneumoniae* B-7487

■ *Enterococcus faecalis* B-4826

■ *Francisella tularensis* B-7559

Распределение нуклеотидов в метагеномном образце Mix 1 при картировании на референсные геномы

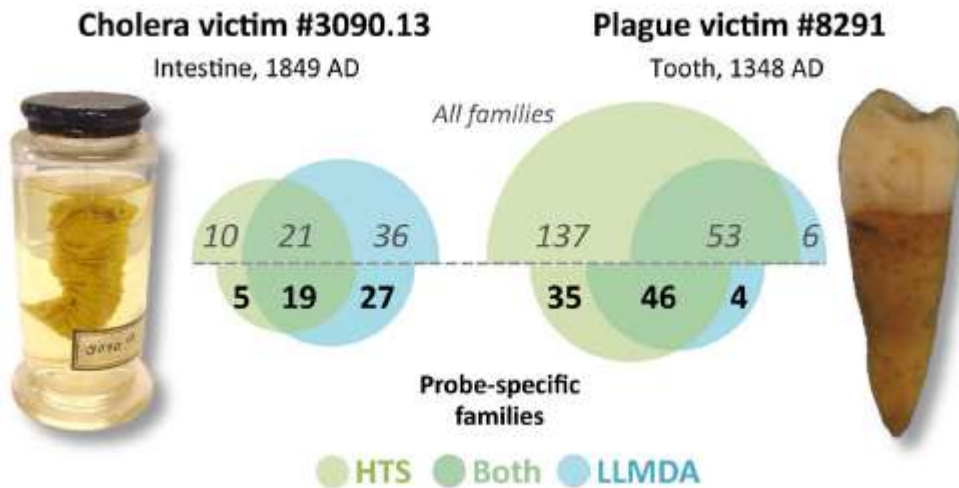


Фрагментарное картирование контигов на референсную последовательность



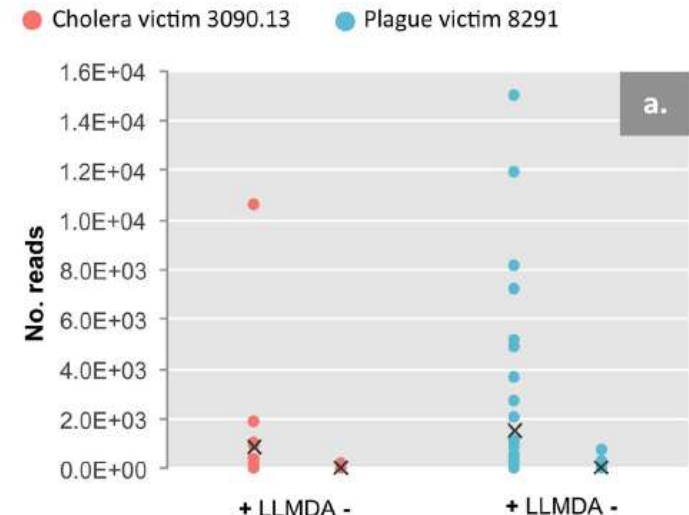
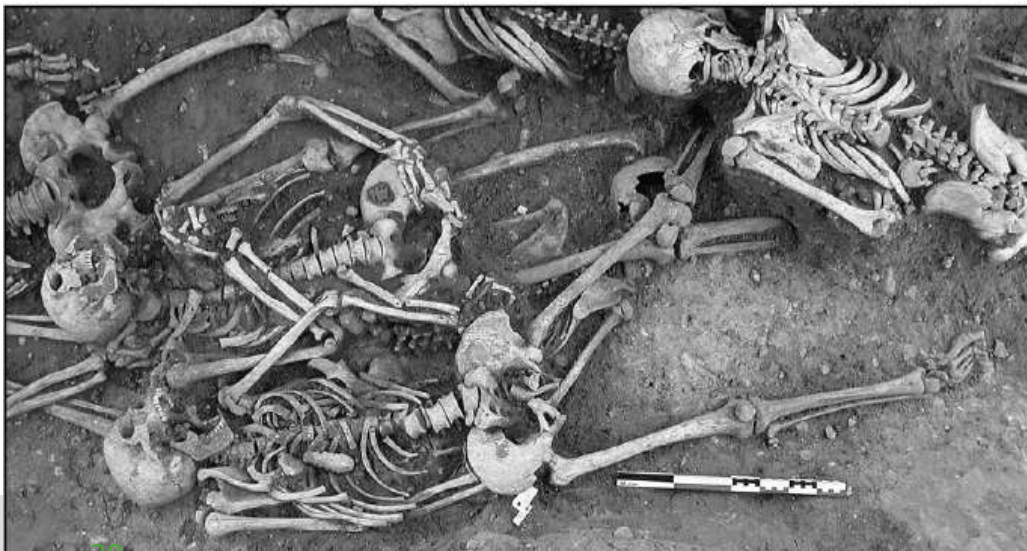
Покрытия ридов

Использование ПЦР и секвенирования в палеомикробиологии



Останки содержат сильно деградированную ДНК, в которых патогенные таксоны – минорные компоненты.

Для выявления микробного разнообразия лучше использовать более дешевую, чем полногеномный сиквенс технологию микроэреэев, в частности Лоуренс Ливермор Микробную Детекцию. Здесь показано, что методы дают хорошо сопоставимые результаты по выявлению количества родов бактерий при холере (кишка) и чуме (зуб).



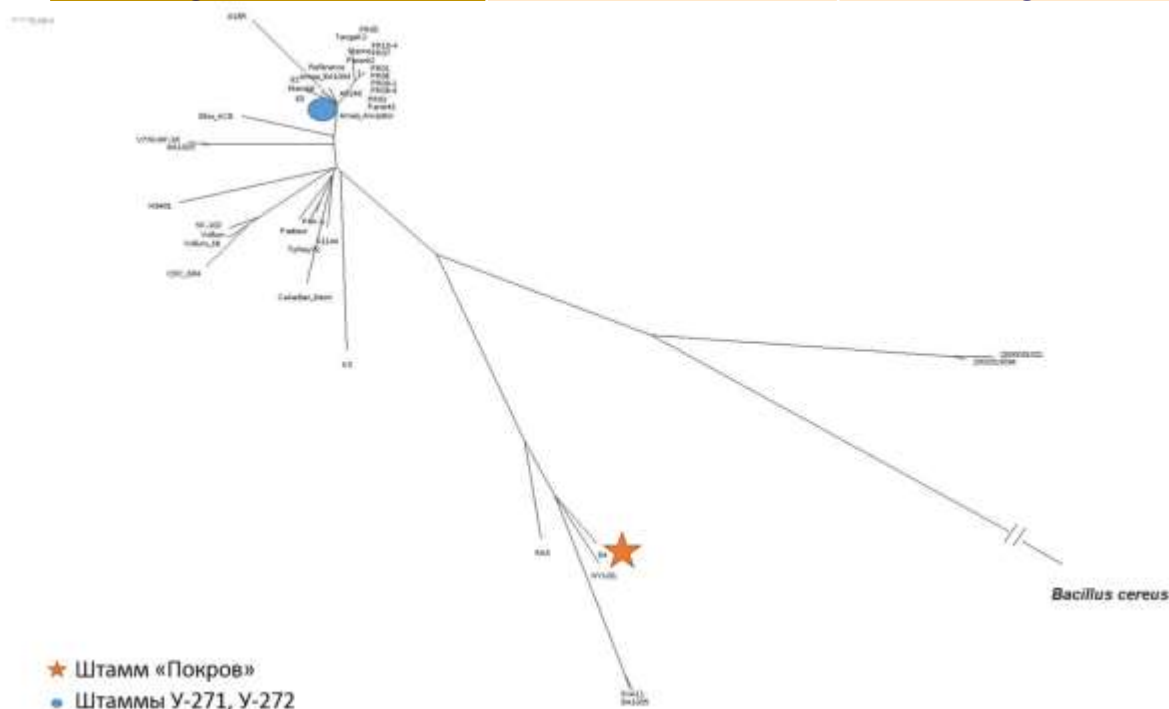
Полногеномный сиквенс штаммов сибирской язвы – Ямало-Ненецкий АО 2016 год

MLVA –типирование

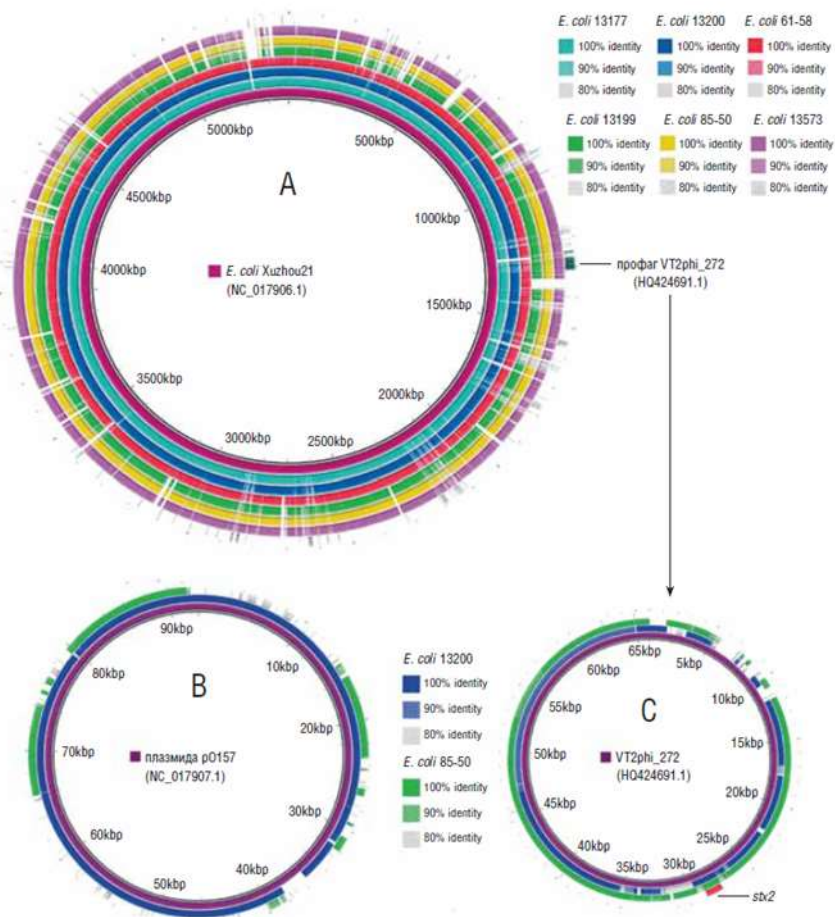
Сиквенс

Штамм 5875 (2016) входит в **клональную группу В** и существенно отличается от штаммов И271 и И272 (1941), входящих в **клональную группу А**. По данным генбанка штамм 5875 близок к европейским и африканским штаммам. Штаммы И271 и И272 близки к классическим северным штаммам.

Локус	Штаммы, выделенные в 1941	Штаммы, выделенные в 2016
vrrA	10	9
Bams 3	25	24
Bams 5	7	7
Bams 22	15	14
Bams 34	11	0
Bams 44	8	8
VNTR23	4	3



Геномный анализ вспышки, вызванной STEC-штаммами с Санкт-Петербурга



Возраст, лет	Абсолютное число	%
<1	10	15,6
1–2	20	31,3
3–6	12	18,8
7–10	3	4,7
11–14	3	4,7
15–19	2	3,1
20–29	5	7,8
30–39	4	6,3
>40	5	7,8
Всего	64	100

Полногеномный сиквенс и MLST. Показана полная идентичность геномов штаммов *E. coli* O157:H7 13177, 13200 и 61-58, выделенных от больных. Геномы трех штаммов серогруппы O101 от ребенка и из молока, также идентичны друг другу.

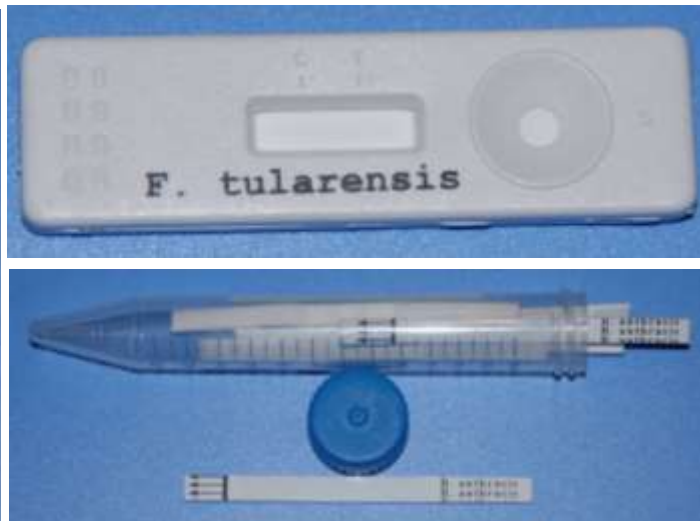
В контигах при секвенировании STEC-штаммов (алгоритм de novo), выявлены все 15 участков генома, используемых для мультилокусного типирования высокопатогенных *E. coli* по схеме вебсайта shigatox.net

Иммунохроматографические тесты

Основа – банк гибридом в «ГКПМ – Оболенск». 2 технологических линии

Хаузенги – тесты в
пластиковом кожухе – 1
тест

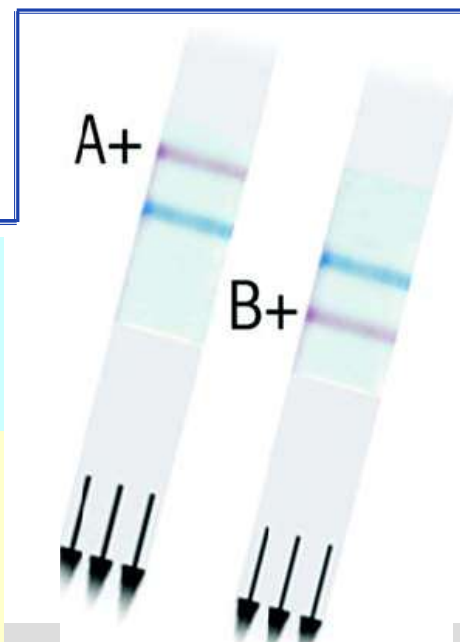
В упаковках по 10-20
тестов. (созданы и
испытаны для гриппа А)



**Легионеллы, листерии, чума (+ антитела),
туляремия, холера (+токсин), сибирская язва
(+споры), грипп**

**Основная задача – поэтапная замена
иммуносуппензионных тестов на более чувствительные и
удобные. Хранение 2 года при комн. температуре.**

Апробированы для СПЭБ.

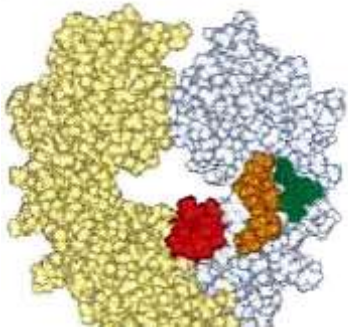


АПТАМЕРЫ

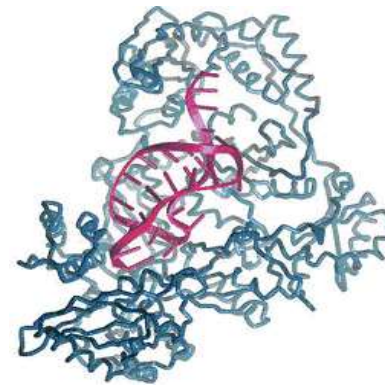
инновационные биодетекторы

Аптамеры – фрагменты ДНК, специфичные к мишеням и отобранные методами высокопроизводительного скрининга *in vitro* из библиотек олигонуклеотидов.

- Чувствительность превышает методы детекции на основе антител.
- Не зависят от иммуногенности мишени
- Хорошо хранятся.



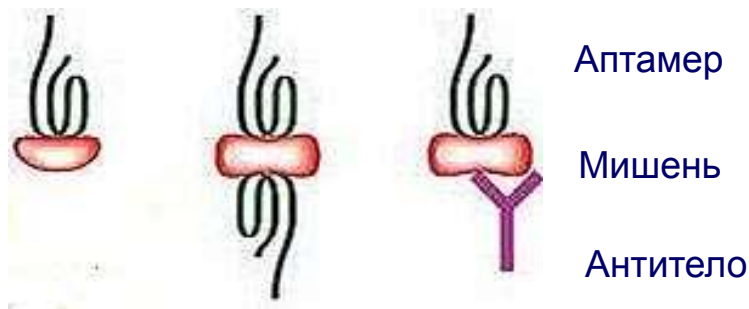
Аптамер к Fc-фрагменту IgG человека



РНК-аптамер в комплексе с тромбином

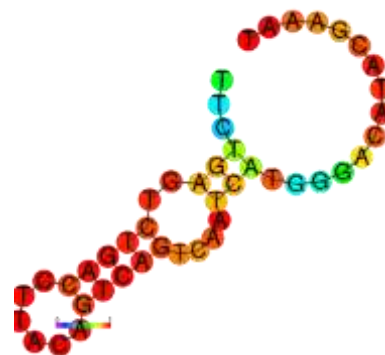
«Иммуно-аптамерный» ПЦР является одной из самых многообещающих технологий высокочувствительной детекции патогенов и их компонентов в ближайшем будущем.

Разработанные аптамеры

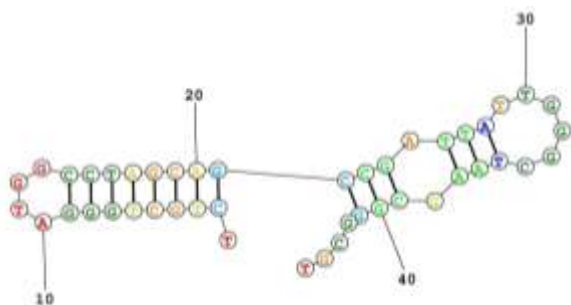


Варианты формирования
детекционного комплекса

```
TTCTGAGTCTGACCTTACAGTCAGTCAA  
TCATGGGACATACGAAAT
```



Первичная и вторичная
структура аптамера,
специфичного к микробным
клеткам *E. coli* O157:H7



Аптамер к
ботуло-
токсину А

В 2012 году в ГНЦ ПМБ впервые получены аптамеры к патогенному штамму ***E.coli* O157:H7**, **ботулотоксину** и **шига-токсину** и разработаны тест-системы на их основе. Используются в Центре индикации и диагностики как дополнительные высокочувствительный тест при анализе образцов.

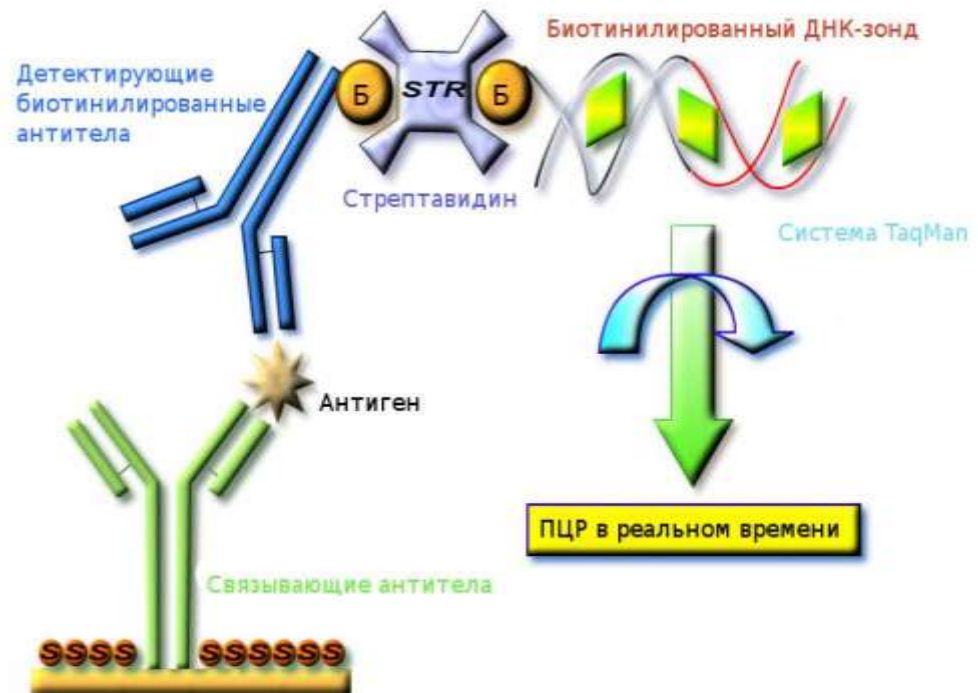
Высокочувствительная биодетекция по иммуно-ПЦР

Иммуно-ПЦР совмещает преимущества ПЦР и иммуноанализа без пробоподготовки. Чувствительность до 1 пг\мл.

Сочетание RT-ПЦР и ELISA, фиксирующие и детектирующие (парные) МКА

образец - 1 мкл,
время – 25 мин.,
чувствительность -
единичные бактерии и
вирусы.

**В 100000 раз
чувствительней ИФА.**



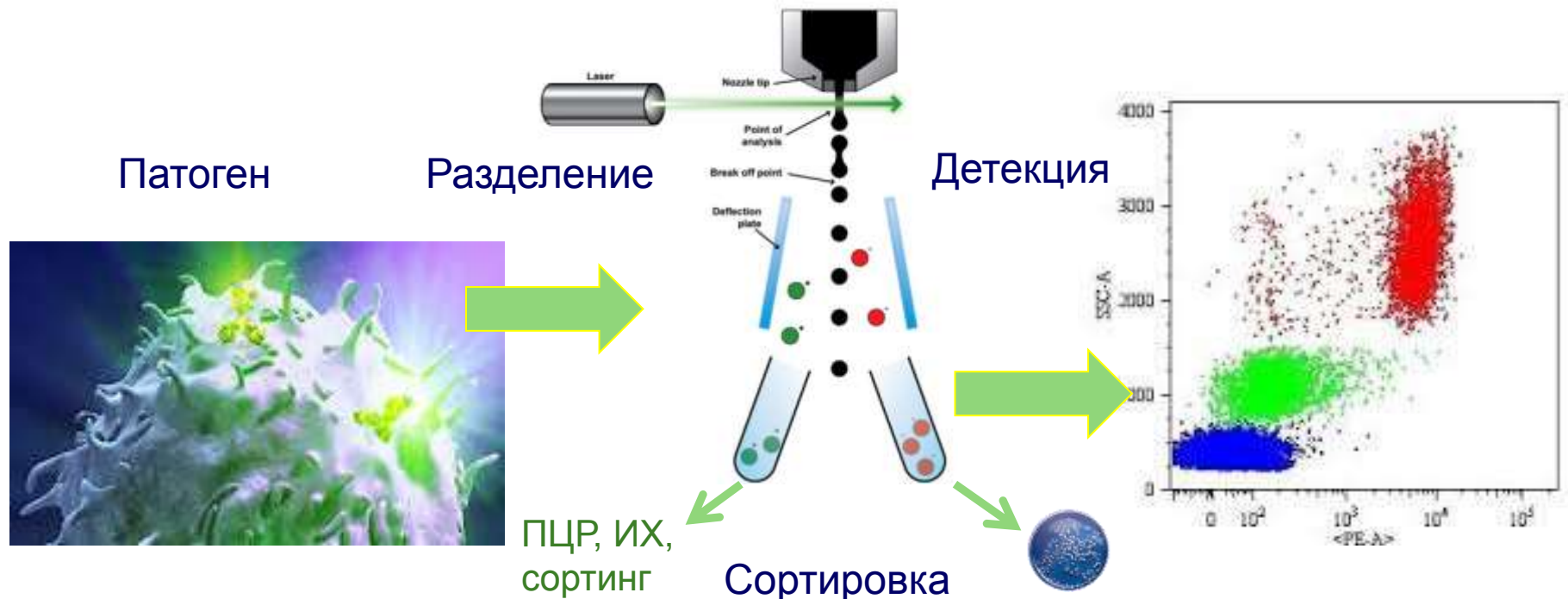
Для ООИ разработаны все отечественные моноклональные антитела

Тест-системы для иммуно-ПЦР

1. Определение **ботулинического нейротоксина типа А** методом иммуно-ПЦР (Тест-система «IPCR-BoNT/A»)
2. Определение **летального фактора сибирской язвы** методом иммуно-ПЦР (Тест-система ИПЦР-ЛФ)
3. Определение **протективного антигена возбудителя сибирской язвы** методом иммуно-ПЦР (Тест-система ИПЦР-ПА)
4. Набор реагентов для определения бактерий **E. coli O157:H7** методом иммуно-ПЦР (Тест-система «IPCR- E.COLI O157:H7»).
5. Набор реагентов для определения бактерий **Listeria monocytogenes** методом иммуно-ПЦР (Тест-система «IPCR - L. MONOCYTOGENES»).
6. Набор реагентов для определения бактерий **Pseudomonas aeruginosa** методом иммуно-ПЦР (Тест-система «IPCR - P. AERUGINOSA»).

Клеточный сортинг – повышение эффективности генодиагностики

- ❖ Клеточный сортинг - выделение индивидуальных клеток патогенов из сложных смесей с возможностью их культивирования и анализа гено- и иммуно- методами. Необходимы парные МКА.
- ❖ Применение в тандеме с полногеномным и/или метагеномным секвенированием позволяет идентифицировать патоген, и в течение 5-50 часов получить чистую культуру.



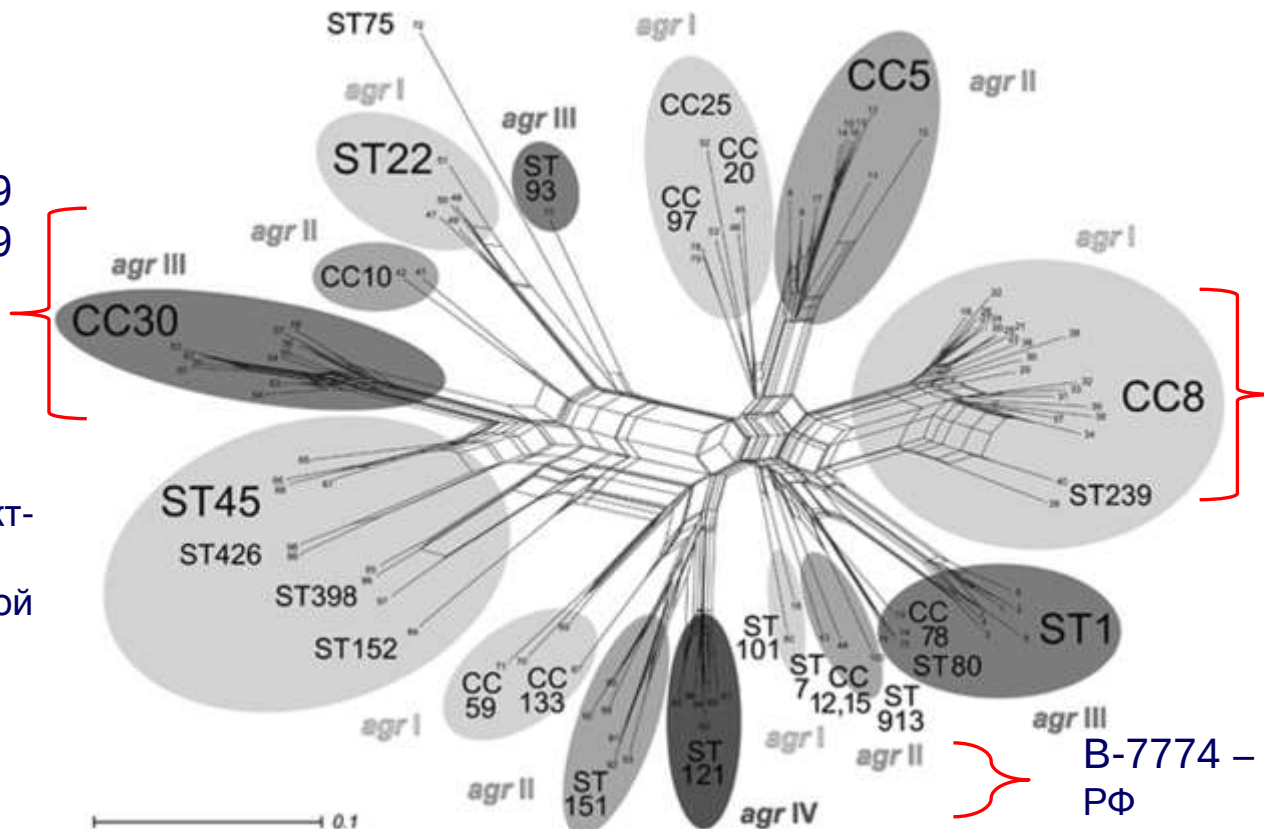
Вспышки пищевой токсикоинфекции 2013-2014 год, вызванные *S.aureus*

год	Регион, контингент	Генетическая линия	Токсины	Число заболевших	Госпитализировано	Источник	
						Продукты	Персонал
2013	С-Пб рабочие	CC30 t2509	ЭТ - А ТТШ	363	223 (7 интенс. терап)	+	
2014	Мордовия, учащиеся СШ	CC12 t888	ЭТ - В	72	16	+	
2014	Тыва, учащиеся интерната	SCC22 t156	ЭТ - С	2	2 (1 летал)		+
2014	Тверская область, лагерь Селигер	CC30 t122	ЭТ - А ТТШ	145	38	+	+
2014	Поезд Абакан-Москва	CC5 t002	ЭТ - А ТТШ	378	58	+	+
2014	Ульяновская область	CC1	ЭТ-А	46	2	+	
ВСЕГО				1006	339		

Полногеномные последовательности *S. aureus*, исследованные в ГНЦПМБ

CC30

В-7438/В-7439
В-7778/В-7779
Возбудители
пищевых
токсико-
инфекций -
массовые
вспышки в Санкт-
Петербурге
(2013) и Тверской
области (2014)



CC8

В-7772/ В-7772
- новый
возбудитель
стафилодермии
новорожденных
=> расширение
экологической
ниши CC8

В-7774 – типичный для
РФ
возбудитель
стафилодермии
новорожденных CC15

CC15

Monecke et al. 2008. FEMS Immunol Med Microbiol

ЭКСФОЛИАТИВНЫЙ ДЕРМАТИТ НОВОРОЖДЁННЫХ

Год	Регион, контингент	Клональная линия <i>S. aureus</i>	Токсины, MRSA	Число изолятов
2012	Оренбургская обл., ООКБ, новорожденные	CC121 t272	Эксфолиативные токсины А и В	14
2013	Белгородская обл., ГДБ, новорожденные	CC15 t084	Эксф. токсин А	20
2014	Белгородская обл., ГДБ и ДОКБ, новорожденные	CC8 t211	Эксф. токсин А MRSA	19
2014	Оренбургская обл. ГБУЗ ОКПЦ	CC12 t156		22
2014	Псковская обл. Перинат. Центр.	CC12 t084	Эксф. токсин А	27
2014	Оренбургская обл. ГKB №2	CC15 CC121	Эксф. токсины А и В	67
2015	Сахалинская обл. ОБ	CC121	Эксф. токсин А	52

Полногеномное секвенирование, публикации и размещение в ГенБанке

Штамм	Номер доступа в ГенБанке
СПб_В-7738	LWRA01000000
СПб_В-7739	LWRB01000000
Селигер_В-7778	LWRC01000000
Селигер_В-7779	LWRD01000000



АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ МИКРОБИОЛОГИИ

Т.Е. Овчинникова¹, Н.В. Абаев², Н.А. Зыкина², Ю.Н. Сарайкин², О.В. Коробова², Н.В. Селезнева², А.Г. Богун²

¹ Правительство Российской Федерации, Москва, Российская Федерация

² ФГБНЦ «Центральный институт микробиологии и иммунологии», Оболеньки, Российская Федерация

Молекулярно-генетическая идентификация штамма *Staphylococcus aureus* — возбудителя пищевой токсикоинфекции при вспышке в Санкт-Петербурге в 2013 г.

Штамм	Номер доступа в ГенБанке
B-7772	LJBK01000000
B-7774	LJBL01000000
B-7777	LJBM01000000



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

genomeAnnouncements



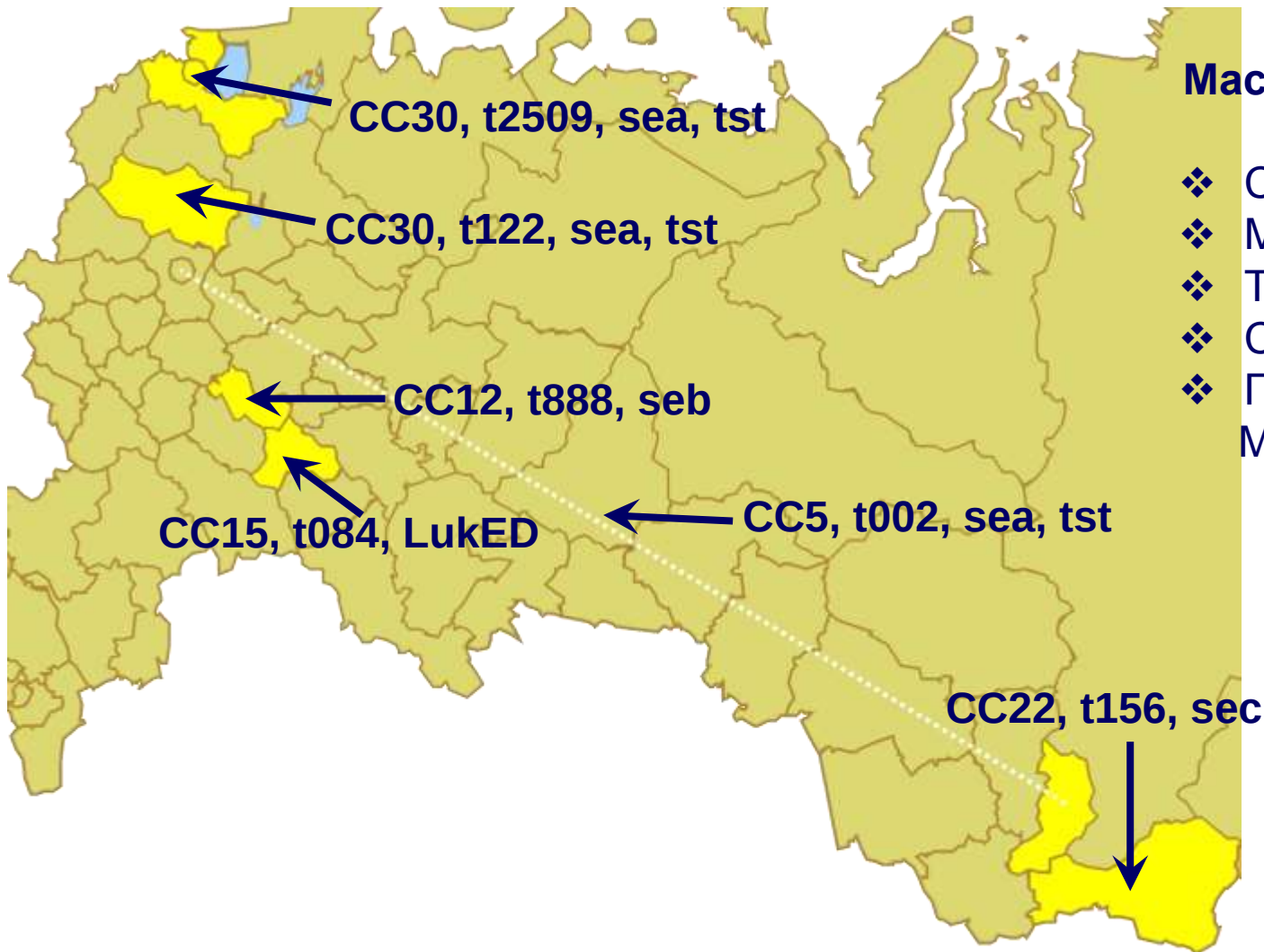
Draft Genome Sequences of Exfoliative Toxin A-Producing *Staphylococcus aureus* Strains B-7772 and B-7777 (CC8/ST2993) and B-7774 (CC15/ST2126), Isolated in a Maternity Hospital in the Central Federal District of Russia

Igor Abaev, Yuri Skryabin, Angelina Kislichkina, Alexandr Bogun, Olga Korobova, Nadezhda Mayskaya, Igor Shemyakin, Ivan Dyatlov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia

ПИЩЕВЫЕ ТОКСИКОИНФЕКЦИИ

клональные линии, сера-типирование, токсины



Массовые вспышки:

- ❖ Санкт-Петербург,
- ❖ Мордовия,
- ❖ Тыва,
- ❖ Селигер,
- ❖ Поезд Абакан-Москва.

Идентификация и типирование *Staphylococcus aureus*

Чистая культура

Молочно-желточно-солевой
агар (10% NaCl)
Кровяной агар (гемолиз)

Генотипирование

coa-ПЦР-ПДРФ, **spa-**
MLST-, **agr-**

Биоанализ данных
Генетическая линия
Частота выделения в
мире штаммов данной
линии

SCCmec-типирование

МПК – тест на уровне
фенотипа
ПЦР-тест на SCCmec
кассету (генотип MRSA)
Определение гена *mecA*
ПЦР-тесты на тип
SCCmec кассеты
Определение
комбинаций *mec* и *scf*
генов, всего 16
вариантов
Определение SCCmec
типа по *j*-региону

Типирование по генам токсинов

ПЦР-тест на токс-гены:
Лейкоцидин Пентона-
Валентайна
Токсин синдрома
токсического шока
Эксфолиативные
токсины А и В
Гемолизины А и В,
Энтеротоксины А, В, С,
Д, Е
Энтеротоксин-подобные
токсины.
Всего 14 типов.

Видовая идентификация

ПЦР-идентификация
Определение генов *nuc*, *coa*, *femA* – выявление
клинически важных видов *S. aureus* и *S. epidermidis*
MALDI Biotyper

Полногеномное
секвенирование *S. aureus*

Красным - тесты в пределах 10 ч

Пример мультиплексной ПЦР. Одновременное выявление чумы, сибирской язвы и туляремии в RT-PCR

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-atc-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)

Пример подвидовой дифференциация в ПЦР *Francisella tularensis* с помощью одного праймера

Электрофореграмма
ампликонов, полученных в
ПЦР с праймером **Chi1f** и
ДНК *F. tularensis*:

1–11 – GeneRuler™ 100 bp
Plus DNA Ladder;

2 – subsp. *holarctica* 15;

3 – subsp. *holarctica* 503;

4 – subsp. *holarctica* bv.
japonica Miura;

5 – subsp. *holarctica* bv.
japonica Jasoe;

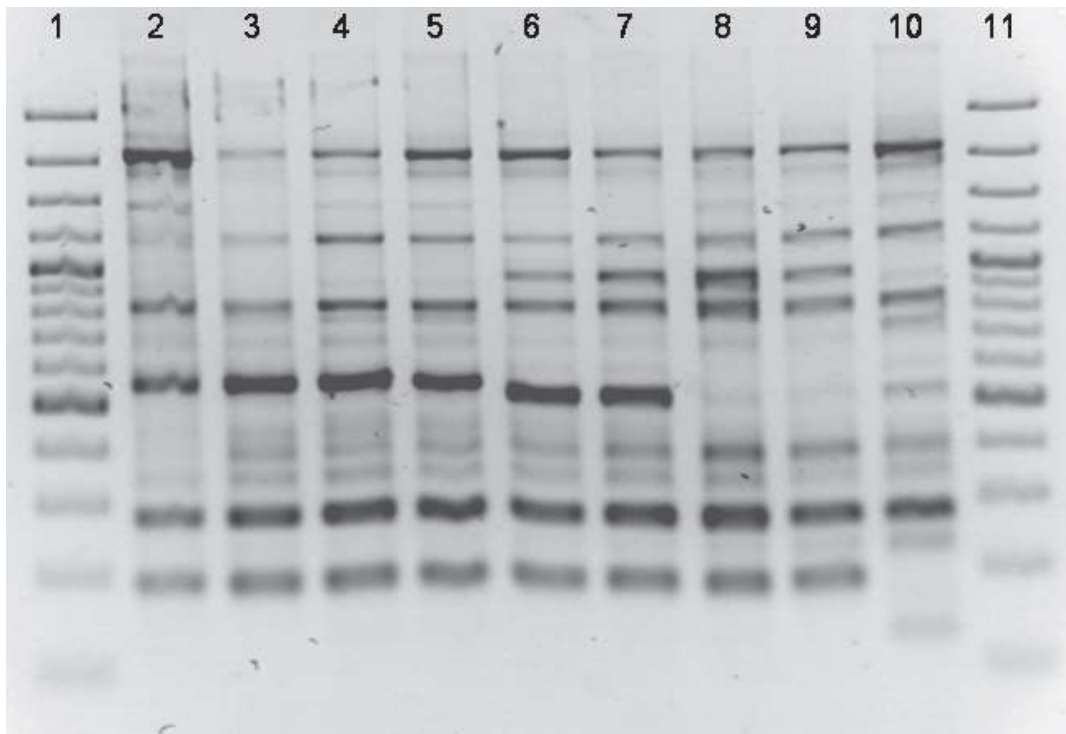
6 – subsp. *tularensis* 8859;

7 – subsp. *tularensis* Schu;

8 – subsp. *mediasiatica* 120;

9 – subsp. *mediasiatica* 117;

10 – subsp. *novicida* Utah 112



Штаммы разных регионов имеют **характерное распределение полос по интенсивности и размерам**. Выделено **пять характерных областей** электрофореграмм.

Продолжение изучения энтероаггративных эшерихиозов

Штамм *E.coli* O104:H4 – вспышка 2011 года в Германии.

Устойчивость к 14 антибиотикам.

Разработаны среды, МР-ПЦР, латексные тесты, ИХ-тесты, бактериофаги для диагностики, полная лабораторная схема исследования.

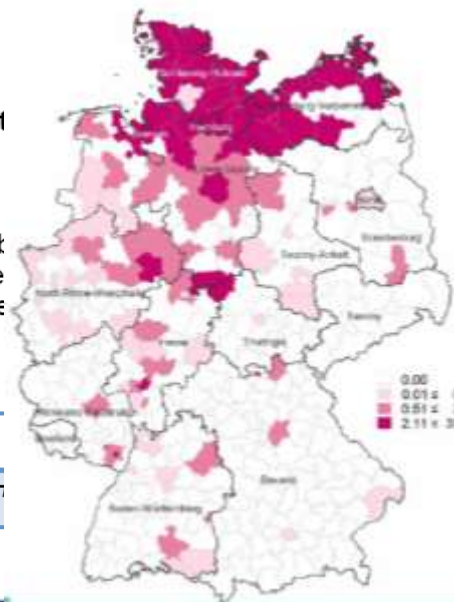


To the recipient laboratory:

State Research Centre for Applied Microbiology & Bio
Moscow Region, Russia
Dr Anisimov

Please find enclosed a stabbed culture of the German outbreak. The original strain has been provided by the National Reference and other Enterics at the Robert Koch Institute and has the

Strain	Serogroup	Genotype
11 2027	O104:H4	<i>eae- vtx2+, H</i>



3842 случая

2987

Не ГЭС STEC

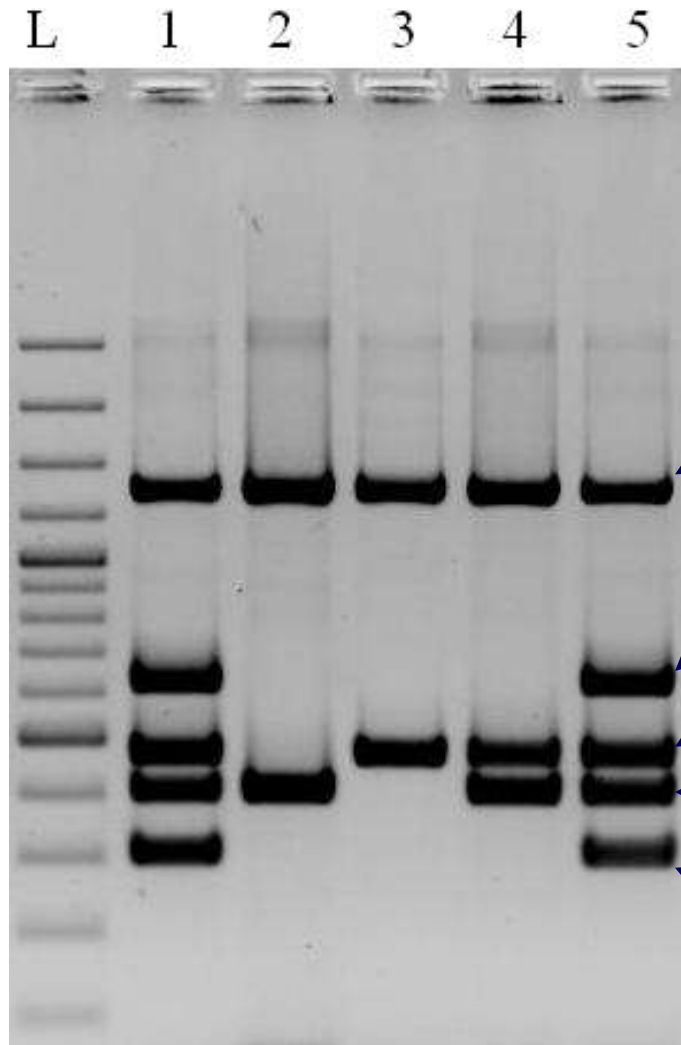
855

ГЭС

18 умерло
(0.6%)

35 умерло
(4.1%)

Результаты МР-ПЦР с праймерами «Мульти-O104»



Созданы и
зарегистрированы
ПЦР и RT-ПЦР

16Sr
RNA

pVCD
43332

stx 2

rfb₁₀₄

fliC_{H4}



- ❖ 1, 5 – *E.coli* O104:H4 (Германия)
- ❖ 2 – *E.coli* O104:H12
- ❖ 3 – *E.coli* O157:H7
- ❖ 4 – *E.coli* O104:H12 + *E.coli* O157:H7
- ❖ L – маркер м. м.

Хронология распространения высоковирулентного штамма E.coli O104:H4

- ❖ Agg-STEC штаммы O104:H4 начали регистрировать с 2001 года, до 2009 г. - 5 спорадических случаев выявления у больных с ГУС в Германии, Франции, Норвегии и Италии.
- ❖ В 2009 г. - 25 случаев больных с ГУС в Грузии - 25 человек заболело, 7 умерло, выделены 2 штамма *E. Coli* O104:H4 с генами *stx2a*, *aggR* и *aatA*, штаммы близки к штаммам из Германии 2011 года. Публикации только через 5 лет.
- ❖ «Германские» штаммы, в отличие от «грузинских» несли ранее неописанную у эшерихий плазмиду с гомологией с плазмидой вирулентности *Yersinia Pestis* pMT. Редкий случай у кишечных инфекций.
- ❖ 2011 г. вспышка ГУС у 8-ми французских туристов, вернувшихся из Турции 2011 г. ещё 9 случаев выделения штамма от больных с ГУС во Франции Дании, Люксембурге и Германии.
- ❖ 2013 г. в Бельгии штаммы были выделены от больного, после посещения Туниса и от ребенка, после посещения Турции. Оба штамма несли основные гены вирулентности, идентичные «Германским» штаммам, а именно: *stx2a*, *aggR* и *aaiC*.
- ❖ **Ни в одном случае не установлен источник заражения**



Спасибо за внимание !

