

- существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина. Журн. микробиол. 2011, 33: 99-109.
4. Терентьева Н.А., Тимченко Н.Ф., Балабанова Л.А., Рассказов В.А. Характеристика образования, ингибирования и разрушения биопленок *Yersinia pseudotuberculosis*, формирующихся на абиотических поверхностях. Журн. микробиол. 2015, 3: 72-78.
  5. Терентьева, Н.А. Тимченко Н.Ф., Голотин В.А., Рассказов В.А. Биологическая активность токсинов *Yersinia pseudotuberculosis*. Журн. микробиол. 2016, 6: 10-19.
  6. Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С., Сомова-Исачкова Л.М. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis*. Владивосток, 2004.
  7. Cornelis G.R. *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. J. Cell. Biology. 2002, 158 (3): 401-408
  8. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 1999, 284: 1318-1322.
  9. Flemming H.C. EPS — then and now. Microorganisms. 2016, (4): 4. pii: E41 PMID: 27869702.
  10. Herrera A., Vu B.G., Stach C.S. et al. Staphylococcus aureus  $\beta$ -toxin mutants are defective in biofilm ligase and sphingomyelinase activity, and causation of infective endocarditis and sepsis. Biochemistry. 2016, 55 (17): 2510-2517. doi: 10.1021/acs.biochem.6b00083.
  11. Huseby M.J., Kruse A. C., Digre J. et al. Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010, 107: 14407-14412.
  12. Lister J.L., Horswill A.R. Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2014, 4: 178.
  13. Schweer J., Kulkarni D., Kochut A. et al. The cytotoxic necrotizing factor of *Yersinia pseudotuberculosis* (CNFY) enhances inflammation and Yop delivery during infection by activation of Rho GTPases. PLoS Pathog. 2013, 9 (11): e1003746. doi: 10.1371/journal.ppat.1003746.
  14. Shak J.R., Ludewick H.P., Howery K.E. et al. Novel role for the *Streptococcus pneumoniae* toxin pneumolysin in the assembly of biofilms. MBio. 2013, 4 (5): e00655-13. doi: 10.1128/mBio.00655-13.
  15. Wen Y., Behiels E., Devreese B. Toxin-Antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. Pathog. Dis. 2014, 70 (3): 240-249. doi: 10.1111/2049-632X.12145.

Поступила 10.06.17

Контактная информация: Терентьева Наталья Александровна, к.б.н., 690022, Владивосток, пр. 100 лет Владивостоку, 159, р.т. (423)231-07-03

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*Р.Б.Городничев, Д.В.Ракитина, А.И.Манолов, Ю.П.Байкова,  
П.Л.Щербаков, Г.Б.Смирнов, Е.Н.Ильина*

## **ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА**

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины, Москва

*Цель.* Оценить пул *E.coli* внутри пораженной зоны кишечника пациентов с болезнью Крона. *Материалы и методы.* Клинические изоляты (28), а также контрольные образцы были протестированы относительно их возможной принадлежности к определенной филогенетической группе, способности к адгезии и инвазии на модели монослоя эпителиальных клеток CaCo2, способности к формированию биопленки и подвижности. *Результаты.* Было показано, что *E.coli*, высеченные из различного биоматериала, отличались по филогенетической принадлежности и способности образовывать биопленку. *E.coli*, относящиеся к типу адгезивно-инвазивных, обнаруживались преимущественно в материале биопсии слизистой кишечника пациентов с болезнью Крона. *Заключение.* Есть основания полагать, что тип адгезивно-инвазивных *E.coli* сложился на стыке экологических ниш просвета и стенки кишечника.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 42—49

Ключевые слова: болезнь Крона, адгезивно-инвазивные *E.coli*, гетерологические модели, биопленки, филогенетическое разнообразие *E.coli*

*R.B.Gorodnichev, D.V.Rakitina, A.I.Manolov, Yu.P.Baykova, P.L.Scherbakov, G.B.Smirnov, E.N.Ilina*

## FEATURES OF *ESCHERICHIA COLI* CLINICAL STRAINS, ISOLATED FROM THE PATIENTS WITH CROHN'S DISEASE

Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

*Aim.* To characterize pool of Crohn's disease-associated *E.coli* isolated from patients with Crohn's disease. *Materials and methods.* 28 clinical stains were selected. Clinical isolates, as well as control samples, were tested for their possible belonging to a certain phylogenetic group, the ability to adhere and invade on the model of a monolayer of CaCo2 epithelial cells, the ability to form biofilms and their mobility. *Results.* We have shown that *E.coli*, isolated from a different bio-material, belonged to different phylogenetic groups and differed in their ability to form biofilms. Adhesive-invasive *E.coli* were found mainly in the material of biopsy of the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Conclusion.* There are reasons to suppose that adhesive-invasive *E.coli* formed at the junction of ecological niches of the lumen and the intestinal wall.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 6, P. 42—49

Key words: Crohn's disease, adhesive-invasive *E.coli*, heterological models, biofilms, phylogenetic diversity of *E.coli*

## ВВЕДЕНИЕ

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) и, в том числе, болезнь Крона — это хронические рецидивирующие заболевания, от которых страдают по всему миру до 500 человек на 100 000 населения, особенно в развитых странах [1], [Agus A. et al., 2014]. Существует несколько точек зрения относительно механизмов патогенеза болезни Крона, но в самом общем виде болезнь Крона — это сложное многофакторное воспалительное заболевание кишечника, сопровождающееся чрезмерным иммунным ответом на фоне нарушения микрофлоры кишечника, генетической предрасположенности и неблагоприятных условий среды.

Одним из существенных особенностей патогенеза болезни Крона является нарушение баланса и состава кишечной микрофлоры — снижение доли Firmicutes и увеличение доли Proteobacteria и Bacteroidetes [Agus A. et al., 2014; Oberk A. et al., 2015], особенно за счет увеличения доли кишечной палочки в общем пуле микроорганизмов [3, 7]. Существенную роль нарушения микробного баланса микрофлоры кишечника подтверждают данные об успешном лечении пациентов с болезнью Крона методом трансплантации кала здоровых доноров и применением пробиотических штаммов *E.coli* [1, 4]

Особый интерес представляет тот факт, что из клинических образцов пациентов в острой фазе болезни Крона часто выделяют изоляты *E.coli*, которые не относятся к уже известным шести патоварам. Эти изоляты были выделены в отдельный патовар адгезивно-инвазивных *E.coli* (АИКП), благодаря их высокой способности к адгезии и инвазии *in vitro* в моделях с применением клеток CaCo2 и I-407, а также способности выживать и размножаться внутри J774-A1 макрофагов, не вызывая их гибели [7]. Молекулярные основы патогенности подобных изолятов до сих пор не установлены, т.к. эти изоляты обладают набором признаков, характерных для разных патоваров и не всегда обладают

известными факторами адгезии и инвазии [3], [Oberk A. et al., 2015]. Существуют данные о повышенной способности данного патогена образовывать биопленки [7]. Штаммы АИКП клонально разнообразны, но принадлежат, в основном, к филогенетической группе В2 [O'Brien C.L. et al., 2016].

Тот факт, что штаммы АИКП выделяют в 36 — 52% случаев у больных и лишь в 6 — 17% случаев у здоровых пациентов [7], с одной стороны, говорит о том, что этот тип *E.coli* ассоциирован с болезнью Крона, а с другой, что и в больном, и в здоровом кишечнике человека присутствует неоднородный пул штаммов *E. coli*.

Целью нашего исследования было оценить пул *E. coli* внутри пораженной зоны кишечника пациентов с болезнью Крона. Для более полного изучения пула *E.coli* у пациентов с диагностированной болезнью Крона был взят биоматериал двух типов: биопсия слизистой кишечника из мест, охваченных воспалительным процессом, и материал просвета кишечника над местами поражения. Для поиска различий в составе пула кишечной палочки все клинические изоляты и контрольные образцы были протестированы относительно принадлежности к определенной филогенетической группе, способности к адгезии и инвазии, способности к формированию биопленки и подвижности.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованные в работе изоляты *E.coli* были отобраны от 3 пациентов с подтвержденной болезнью Крона.

Критериями включения пациентов в исследование являлись: возраст от 18 до 65 лет, подтвержденная эндоскопически и гистологически болезнь Крона с поражением подвздошной кишки, исключение у них недифференцированного колита, отсутствие каких-либо инфекционных заболеваний, отсутствие в анамнезе оперативных вмешательств на кишечнике, отказ от приема антибиотиков за последние 6 мес.

Все пациенты были проинформированы об участии в исследовании и дали свое согласие.

В исследование были включены две женщины 29 и 40 лет с терминальным илеитом и мужчина 23 лет с илеоколитом, которые проходили амбулаторное лечение в Центральном научно-исследовательском институте гастроэнтерологии и Государственном научном центре колопроктологии в Москве с 2012 по 2014 гг.

Подготовку кишечника пациентов к колоноскопии проводили по стандартной методике. После соблюдения больными в течение 3 дней бесшлаковой диеты, они принимали раствор полиэтиленгликоля 4000. Стандартный объем полиэтиленгликоля рассчитывается как 1 литр раствора на 20 кг веса. Однако учитывая анамнез больных, наличие у них многократного (более 6 раз в день) стула, ограничились половинной дозой полиэтиленгликоля, который больные принимали накануне исследования. Данная схема подготовки позволила качественно провести колоноилеоскопию. Небольшое количество прозрачной жидкости, которое находилось у больных в просвете толстой кишки легко аспирировалось. В то же время, половинный объем принятого полиэтиленгликоля позволил сохранить кишечное содержимое в просвете подвздошной кишки.

Отбор биоматериала пациентов проводили во время проведения илеоскопии. В процессе эндоскопии из просвета подвздошной кишки аспирировали содержимое в стерильные контейнеры в объеме 20 — 40 мл. Биопсию слизи-

стой оболочки проводили после аспирации содержимого. Биоптаты брали из измененной периульцерозной слизистой оболочки. У каждого больного брали по 4 биоптата: 2 фрагмента СО помещались в стерильную сухую пробирку для проведения в дальнейшем исследования микрофлоры, 2 помещали в 10% раствор формалина для проведения гистологического исследования.

Жидкость, отобранную из просвета кишечника, разводили примерно  $\times 10^6$  раз стерильным PBS (фосфатный буфер), образцы биопсии слизистой кишечника размещали в 0,2 мл стерильного PBS. Полученный инокулят в объеме 0,1 мл наносили на чашки с LB агаром (Amresco, USA). После инкубации в течение ночи при 37°C образовавшиеся колонии были идентифицированы с помощью Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) Biotyper software (Bruker Daltonics, Germany) с использованием Microflex LT (Bruker Daltonics, Germany).

В исследование были включены 28 клинических изолятов *E.coli*, высеянных из материала трех пациентов с диагностированной болезнью Крона. Контрольную группу составили 5 образцов *E.coli*, 2 из которых были лабораторными штаммами (MG1655 и Nissle1917), а 3 были высеяны из кала здоровых пациентов.

Способность штаммов *E.coli* к адгезии и инвазии на модели клеточной линии CaCo2 оценивали аналогично стандартным методикам с небольшими модификациями [2, 6, 8]. Клеточную линию дифференцированных эпителиальных клеток кишечника CaCo2 выращивали в 24-луночном планшете в среде DMEM (DMEM, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) с добавлением 20% бычьей эмбриональной сыворотки до развития монослоя клеток ( $5 \times 10^5$  кл/лунку). Монослой заражали нормированной ( $D_{620}=0,5$ ) суспензией *E.coli* и инкубировали 2 часа в термостате при температуре 37°C. После инкубации монослой промывали, лизировали 1% раствором NP40 (Sigma), а количество адгезированных клеток определяли методом посева на чашки с LB агаром. Параллельно над монослоем, инкубированным с суспензией *E.coli*, меняли культуральную среду на среду, содержащую 1мг/мл меропенема (BIOPHARM, Pvt. Ltd, Индия) для того, чтобы убить все внеклеточные бактерии. После часовой инкубации в присутствии антибиотика монослой промывали, лизировали 1% раствором NP40 (Sigma), и количество инвазированных клеток определяли методом посева на чашки с LB агаром.

Способность к инвазии определяли как отношение количества инвазированных клеток к исходному количеству *E.coli*, инокулированных в начале опыта, выраженное в процентах. Способность к адгезии определяли как разницу между количеством клеток на монослой после 2 часов инкубации и количеством инвазированных клеток, поделенную на количество клеток CaCo2 в монослое, и выражали в КОЕ *E.coli* на клетку CaCo2. Каждое измерение проводили троекратно.

Способность образовывать биопленку оценивали по методике определения формирования биопленки на абиогенных поверхностях [Coffey V. et al., 2014]. В эксперименте использовали ночные культуры кишечной палочки (18 часов инкубации в бульоне LB в термостате при температуре 37°C), приведенные к оптической плотности  $D_{570}=0,5$ . В лунку 96-луночного планшета добавляли 190 мкл бульона LB и инокулировали его 10 мкл подготовленной суспензии кишечной палочки, по 5 статистических повторов для каждого образца. Планшеты с инокулированной средой инкубировали в термостате при температуре 37°C в трех параллелях — 5, 9 и 24 часа. После инкубации среду убирала, лунки трижды промывали дистиллированной водой. Для окрашива-

ния биопленок в каждую лунку добавляли 180 мкл дистиллированной воды и 20 мкл 1% спиртового раствора кристаллического фиолетового и окрашивали в течение 45 минут. По истечении времени краситель сливали, лунки промывали дистиллированной водой 3 раза и добавляли 200 мкл 95% этанола на 45 минут для экстракции красителя. После экстракции количество красителя определяли на планшетном фотометре (Thermo Fisher Scientific Multiscan Ascent) при длине волны 570 нм. В качестве контроля использовали среду без бактерий.

Ночные культуры *E.coli*, выращенные на LB агаре, вкалывали стерильной зубочисткой в среду, содержащую 1% триптона и 0,25% NaCl и 0,3% агара [9]. Подвижность оценивали по диаметру ореола в мм на 5, 7, 9 и 12 час инкубации.

Определение филогенетической принадлежности изолятов *E.coli* проводили стандартным методом с применением ПЦП [5]. Праймеры на исследуемые гены: *ChuA.1* (5' TGGGCGAACTGAAAATCTGG 3') и *ChuA.2* (5' CGGCAAATAGAGTGG AACGG 3'), *YjaA.1* (5' AGACGCTGCCTTCAGTAACC 3') и *YjaA.2* (5' AACCTGTGACAAACCGCCC 3') и *TspE4C2.1* (5' ATTCAGaGGTGACACTATTCG 3') и *TspE4C2.2* (5' TTGCGGGTGAGACAGAAACG 3') были подобраны так, чтобы в процессе амплификации получались фрагменты длиной в 440, 181 и 131 пар нуклеотидов соответственно.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все проанализированные нами изоляты *E.coli* показали филогенетическое разнообразие и являлись представителями филогенетических групп А, В2 и D. Изоляты *E.coli*, высеянные из кала здоровых доноров, также принадлежали к филогенетическим группам А, В2 и D, что является свидетельством наличия в организме здорового человека неоднородного пула *E.coli* различного филогенетического состава.

При рассмотрении филогенетической принадлежности изолятов *E.coli*, высеянных из биоматериала пациентов с болезнью Крона, прослеживается зависимость филогенетической принадлежности *E.coli* от типа биоматериала. Так, 12 из 17 (76%) изолятов *E.coli*, высеянных из материала биопсий слизистой кишечника, взятых из воспаленной ткани вблизи язвы, принадлежали к филогенетической группе А, а 8 из 12 (67%) изолятов *E.coli*, высеянных из материала просвета кишечника, принадлежали к филогенетической группе В2. Изоляты *E.coli* коменсальной флоры кишечника, как правило, принадлежат к филогенетической группе А, а патогенные внекишечные штаммы чаще всего относятся к филогруппам В2 и D [5]. Это представляется значимым наблюдением в связи с тем, что в месте воспаления мы обнаруживаем доминирование изолятов *E.coli*, принадлежащих к филогенетической группе А, т.е. представителей коменсальной флоры, а изоляты *E.coli*, принадлежащие к филогенетической группе В2, наоборот, чаще доминируют в просвете кишечника.

Учитывая принцип Гаузе, подобное распределение филогенетической принадлежности со значительным превалированием одной филогенетической группы в одном типе биоматериала может являться косвенным свидетельством наличия двух экологических ниш в месте воспаленной ткани эпителия кишечника и в просвете кишечника.

Одним из основных признаков вирулентности бактерий считается способность к адгезии и инвазии при взаимодействии с эукариотическим клетками. Способность проникать и развиваться внутри человеческих клеток — одно из

свойств, способствующих возникновению воспалительного процесса, который, в свою очередь, является неотъемлемой частью патогенеза болезни Крона.

Способность к адгезии и инвазии *E.coli* была протестирована в модельных опытах *in vitro* с использованием монослоя эпителиальных клеток CaCo2. Мы ожидали увидеть разницу в способности к адгезии и инвазии между изолятами *E.coli*, высеянными из материала биопсии слизистой кишечника, и *E.coli*, высеянными из материала просвета кишечника, но изоляты *E.coli*, полученные из различного типа биоматериала, достоверно не отличались по способности к адгезии и проникновению в монослой эпителиальных клеток CaCo2.

Способность к адгезии изолятов *E.coli* с использованием монослоя эпителиальных клеток CaCo2 колебалась от 0,7 до 10 кл. *E.coli* на клетку CaCo2, способность к инвазии — от 0 до 0,25%. По способности к адгезии клинические изоляты в среднем слабо отличались от контрольной группы. Способность к инвазии клинических изолятов, напротив, в среднем, была несколько выше контрольных значений.

Способность образовывать биопленку является важной характеристикой клинических изолятов. Количество образованной биопленки, как правило, зависело от времени инкубации и было максимальным на 5 и 9 час инкубации, а к 24 часу клетки преимущественно переходили в планктонную форму. Количество образованной биопленки, измеряемое величиной светопоглощения, варьировало в пределах от 0 до 1 и в среднем равнялось 0,35 на 5 и 9 час инкубации, а на 24 час инкубации среднее значение биопленкообразования составляло всего 0,1.

Количество образованной биопленки на 5 и 9 час инкубации было в среднем достоверно выше в образцах *E.coli*, высеянных из материала биопсии слизистой кишечника, взятого из воспаленной ткани вблизи язвы, и образцах контрольной группы, чем в образцах *E.coli*, высеянных из материала просвета кишечника.

Подвижность — важный физиологический показатель, позволяющий оценить способность клеток активно перемещаться в сторону более благоприятных условий. Наличие у *E. coli* длинных полярных фибрилл и пилей является основным механизмом клеточного движения, а также может являться одним из факторов адгезии. Хотя логично было предположить более высокий показатель подвижности изолятов *E.coli*, высеянных из материала просвета кишечника, динамика подвижности всех изолятов *E.coli* имела вид линейной зависимости и зависела скорее от характеристик каждого конкретного образца, чем от типа биоматериала, из которого *E.coli* были высеяны.

Одним из возможных путей патогенеза при болезни Крона является наличие особого типа кишечной палочки — адгезивно-инвазивной кишечной палочки. Эту группу, не имеющую молекулярно-биологических маркеров, выделяют по нескольким физиологическим характеристикам, в т.ч. способности к адгезии на клетках монослоя эпителиалия CaCo2, превышающей 1 кл *E.coli* на клетку CaCo2, и способности к инвазии, превышающей 0,1% [7].

Среди исследованных изолятов *E.coli* критериям АИКП удовлетворяли 9 клинических изолятов, выделенных от пациентов с болезнью Крона. Изоляты *E.coli*, соответствующие критериям АИКП, были обнаружены у всех трех пациентов с болезнью Крона и не обнаружены среди контрольных образцов. Среди них преобладали изоляты, выделенные из материала биопсии слизистой кишечника (три от пациента P1, два от пациента P2 и три от пациента P3).

Один клинический изолят *E.coli*, удовлетворяющий критериям АИКП, был обнаружен в материале просвета кишечника пациента Р1.

Сравнивая группу АИКП с общим пулом изолятов, можно наблюдать сближение средних значений способности к адгезии и инвазии оставшихся изолятов *E.coli*, выделенных из различного биоматериала пациентов с болезнью Крона, а также уменьшение разброса внутри отдельных групп.

Филогенетическая характеристика этих изолятов *E.coli* показала, что 4 из 9 (1 изолят *E.coli*, высеянный из материала просвета кишечника, и 3 изолята *E.coli* из материала биопсии слизистой кишечника) принадлежали к филогенетической группе В2, а 5 изолятов *E.coli*, высеянных из материала биопсии слизистой кишечника, принадлежали к филогенетической группе А. Таким образом, из 4 изолятов *E.coli*, высеянных из материала биопсии слизистой кишечника и принадлежащих к филогенетической группе В2, 3 отвечали критериям АИКП, а их доля среди всех изолятов *E.coli*, высеянных из материала биопсий слизистой кишечника и отвечающих критериям АИКП, составляла 44%. Доля изолятов *E.coli*, принадлежащих к филогенетической группе В2, в общем пуле изолятов *E.coli*, высеянных из материала биопсии слизистой кишечника, была ниже и составляла всего 29%. Это подтверждает наблюдения, что изоляты адгезивно-инвазивных *E.coli* чаще являются представителями филогенетической группы В2 [O'Brien C.L. et al., 2016].

Изоляты адгезивно-инвазивных *E.coli* не отличались от остальных изолятов подвижностью.

При сравнении изолятов *E.coli*, отвечающих критериям АИКП, с общим пулом изолятов *E.coli* можно наблюдать промежуточное положение группы АИКП между изолятами *E.coli*, высеянными из материала биопсии слизистой кишечника и просвета кишечника, по способности к формированию биопленки.

Ранее было показано, что способность к формированию биопленки достоверно разделяет изоляты *E.coli* по типу биологического материала, из которого они были получены. Промежуточное положение и большой разброс способности к образованию биопленки в группе АИКП может свидетельствовать о том, что *E.coli*, отвечающие критериям АИКП, существуют на стыке экологических ниш и экологическое преимущество от способности образовывать биопленку не постоянно во времени.

Косвенным свидетельством правомерности выделения группы адгезивно-инвазивных *E.coli* является наличие достоверных корреляционных связей между исследуемыми параметрами внутри этой группы и отсутствием подобных связей во всем пуле изолятов или в группах, выделяемых по типу исходного биоматериала. Так, внутри группы адгезивно-инвазивных *E.coli* между собой (с достоверностью  $p=0,05$  и коэффициентом корреляции по Спирману выше 0,7) были связаны количество образуемой биопленки, подвижность и принадлежность к филогенетической группе. Высокая подвижность, как правило, коррелировала с высоким количеством образованной биопленки и филогенетической группой А. Связь между подвижностью и способностью образовывать биопленку ранее уже описывалась в литературе[9].

Принимая во внимание тот факт, что в группе адгезивно-инвазивных *E.coli* при доминировании изолятов, высеянных из материала биопсии слизистой кишечника, выше представленность *E.coli* филогенетической группы В2, а по количеству образуемой биопленки адгезивно-инвазивные *E.coli* занимают промежуточное положение между изолятами *E.coli*, высеянными из материала биопсии слизистой кишечника и просвета кишечника, а также принцип

Гаузе, ограничивающий возможность разным видам занимать одну экологическую нишу — есть основание предполагать, что формирование группы адгезивно-инвазивных *E.coli* происходило на стыке двух экологических ниш поверхности эпителия и просвета кишечника.

*Авторы благодарят за помощь в подготовке и выполнении исследования Лазорева В.Н., Шитикова Е.С. Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №16-15-00258.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ahmed I., Roy B. C., Khan S. A. et al. Microbiome, metabolome and inflammatory bowel disease. *Microorganisms*. 2016, 4 (2): 20.
2. Baumgart M., Dogan B., Rishniw M. et al. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J*. 2007, 1 (5): 403-418.
3. Carrière J., Darfeuille-Michaud A., Nguyen H. T. Infectious etiopathogenesis of Crohn's disease. *World J. Gastroenterol*. 2014, 20 (34): 12102-12117.
4. Comito D., Cascio A., Romano C. Microbiota biodiversity in inflammatory bowel disease. *Italian J. Pediatrics*. 2014, 40 (1): 1.
5. Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied Environmental Microbiology*. 2000, 66 (10): 4555-4558.
6. Liang X., Ji Y. Comparative analysis of staphylococcal adhesion and internalization by epithelial cells. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) protocols*. 2007, p. 145-151.
7. Martinez-Medina M., Garcia-Gil L.J. *Escherichia coli* in chronic inflammatory bowel diseases: An update on adherent invasive *Escherichia coli* pathogenicity. *World J, Gastrointest. Pathophysiol*. 2014, 5 (3): 213-227.
8. Martinez-Medina M., Aldeguer X., Lopez-Siles M. et al. Darfeuille-michaud a molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2009, 15 (6): 872-882.
9. Wood T.K., Barrios A.F.G., Herzberg M., Lee J. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2006, 72 (2): 361-367.

*Поступила 20.03.17*

Контактная информация: Городничев Р.Б.,  
119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*А.М.Кудряшова<sup>1</sup>, О.В.Борисова<sup>1</sup>, Н.А.Михайлова<sup>1</sup>, Д.В.Лоншаков<sup>2</sup>, А.В.Катлинский<sup>2</sup>*

### **ВЛИЯНИЕ МЕТОДОВ ИММОБИЛИЗАЦИИ ЭРИТРОПОЭТИНА НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgG К чЭПО В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ЖИВОТНЫХ**

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, <sup>2</sup>Биофармацевтическая компания ООО «Форт», Москва

*Цель.* Исследование влияния методов иммобилизации эритропоэтина на чувствительность выявления специфических IgG к человеческому эритропоэтину (чЭПО) в сыворотках крови экспериментальный животных. *Материалы и методы.* В работе использовали сыворотки крови кроликов и морских свинок, полученных после введения препаратов эритропоэтина. Схемы иммуноферментного метода включали варианты пассивной иммобилизации человеческого рекомбинантного эритропоэтина (чрЭПО) на планшете и два варианта иммунохимической иммобилизации: связывание биотинилированного чрЭПО в лунках планшета с пассивно иммобилизованным стрептавидином и связывание чрЭПО с пассивно иммобилизованными на планшетах антителами к эритропоэтину. *Результаты.* Показано, что иммунохимическая иммобилизация приводит к повышению чувствительности в диапазоне от 2 до 10 раз при выявлении антител к чЭПО по сравнению