

ЗНАЧЕНИЕ ХЕМОТАКСОНОМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НИЖЕГОРОДСКОГО НИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ им. АКАД. И.Н. БЛОХИНОЙ В СОВРЕМЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Г.К. Дегтева, Е.В. Беляева, Г.Б. Ермолина

*Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. академика И.Н. Блохиной*

В работе представлены результаты многолетних исследований белковых систем и жирных кислот бактерий различных таксономических групп. На основании комплексного изучения филогенетически разных белков бактерий разработан методологический подход, позволяющий получить целостное представление о составе белков микробной клетки и успешно проводить дифференциацию бактерий на уровне рода, вида и внутри вида, используя спектры белков и жирных кислот бактерий.

Среди различных направлений научной деятельности Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии значительное место всегда занимали таксономические исследования. Направление по классификации и идентификации микробов было создано Ф.Т. Гринбаумом и академиком РАМН И.Н. Блохиной.

И.Н. Блохина уделяла большое внимание развитию генетической систематики бактерий на уровне анализа ДНК, и в ее работах были существенно развиты критерии этого метода. Однако Ирина Николаевна справедливо считала, что следует развивать и другие подходы к классификации бактерий, в частности хемотаксономию, позволяющую классифицировать бактерии по оценке химических различий клеточных компонентов.

Различные направления в хемотаксономии были доверены И.Н. Блохиной её ученикам — Г.К. Дегтевой в изучении белковых систем и Л.М. Пинчук в исследовании жирных кислот. Эти направления развивались далее другими сотрудниками института, работавшими совместно и под руководством Г.К. Дегтевой и Л.М. Пинчук.

Одним из ведущих звеньев в структурно-функциональной организации всех систем бактериальной клетки являются белки. Поэтому закономерно в целях дифференциации бактерий подвергать фундаментальному сравнительному анализу белковые системы бактериальной клетки. Исследования в этой области проводились с использованием современных методов физико-химического и биохимического анализа — от выделения отдельных субклеточных компонентов и их белковых составляющих до фракционирования белков в различных системах полиакриламидного геля методом электрофореза и изоэлектрического фокусирования.

В результате многолетних исследований белковых систем бактерий различных таксономических групп был разработан методологический подход, основанный на комплексном изучении филогенетически различных белков бактерий. Он позво-

ляет получить целостное представление о составе белков микробной клетки, и в то же время проводить дифференциацию на уровне рода, вида и внутри вида.

Обнаружено, что внутривидовыми метками (эпидмаркерами) являются спектры внеклеточных белков и белков наружной мембраны (таблица).

Таблица

**Эпидемиологическое маркирование возбудителей
инфекционных заболеваний по их белковым системам**

<i>Род, вид</i>	<i>Белковая система</i>	<i>Уровень дифференциации</i>
<i>Бактерии рода Staphylococcus</i>	<i>Внеклеточные белки</i>	<i>Штамм</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Внеклеточные белки</i>	<i>Серотип</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Внеклеточные белки</i>	<i>Штамм</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Белки наружной мембраны</i>	<i>Штамм</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Белки наружной мембраны</i>	<i>Штамм</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Белки наружной мембраны</i>	<i>Штамм</i>
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Белки наружной мембраны</i>	<i>Штамм</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Белки наружной мембраны</i>	<i>Штамм</i>
<i>Бактерии рода Acinetobacter</i>	<i>Белки наружной мембраны</i>	<i>Штамм</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Белки наружной мембраны</i>	<i>Штамм</i>

Работами с практическими эпидемиологами и микробиологами Нижнего Новгорода и ведущими учреждениями России было показано, что белки как эпидмаркеры могут с успехом использоваться при наблюдении за циркуляцией госпитальной микрофлоры в стационарах разного профиля (учреждения родовспоможения, хирургические, соматические, кардиологические, ожоговые стационары, при пищевых отравлениях) (рис.). Исследования в этой области были подробно освещены во многих печатных работах и монографии (Дегтева, Беляева, Ермолина, 1999).

На основе изучения биохимических свойств коагулазоотрицательных стафилококков были разработаны системы индикаторные бумажные. Созданы биотехнологические схемы получения отечественных препаратов нуклеазы и протеазы стафилококков, применяемые для изучения первичной структуры ДНК и белков. Результаты этих исследований оформлены в виде монографии и находятся в печати.

Изучение жирных бактериальных кислот в таксономических целях проводилось Л.М. Пинчук, Е.А. Вороновой.

Жирные кислоты — обязательные компоненты большинства микробных клеток, их профили имеют специфические черты у представителей разных таксонов бактерий, а широкое изучение их стало возможным благодаря развитию техники газохроматографического анализа, который обладает высокой разделительной способностью и чувствительностью, требует небольших затрат времени и может быть полностью автоматизирован. Информация о составе жирных кислот бактерий отвечает всем требованиям, предъявляемым к хемотаксономическому признаку: 1) универсальность, приложимость к большому числу микроорганизмов; 2) наличие отчетливых различий у разных таксономических групп 3) доступность требуемой информации.

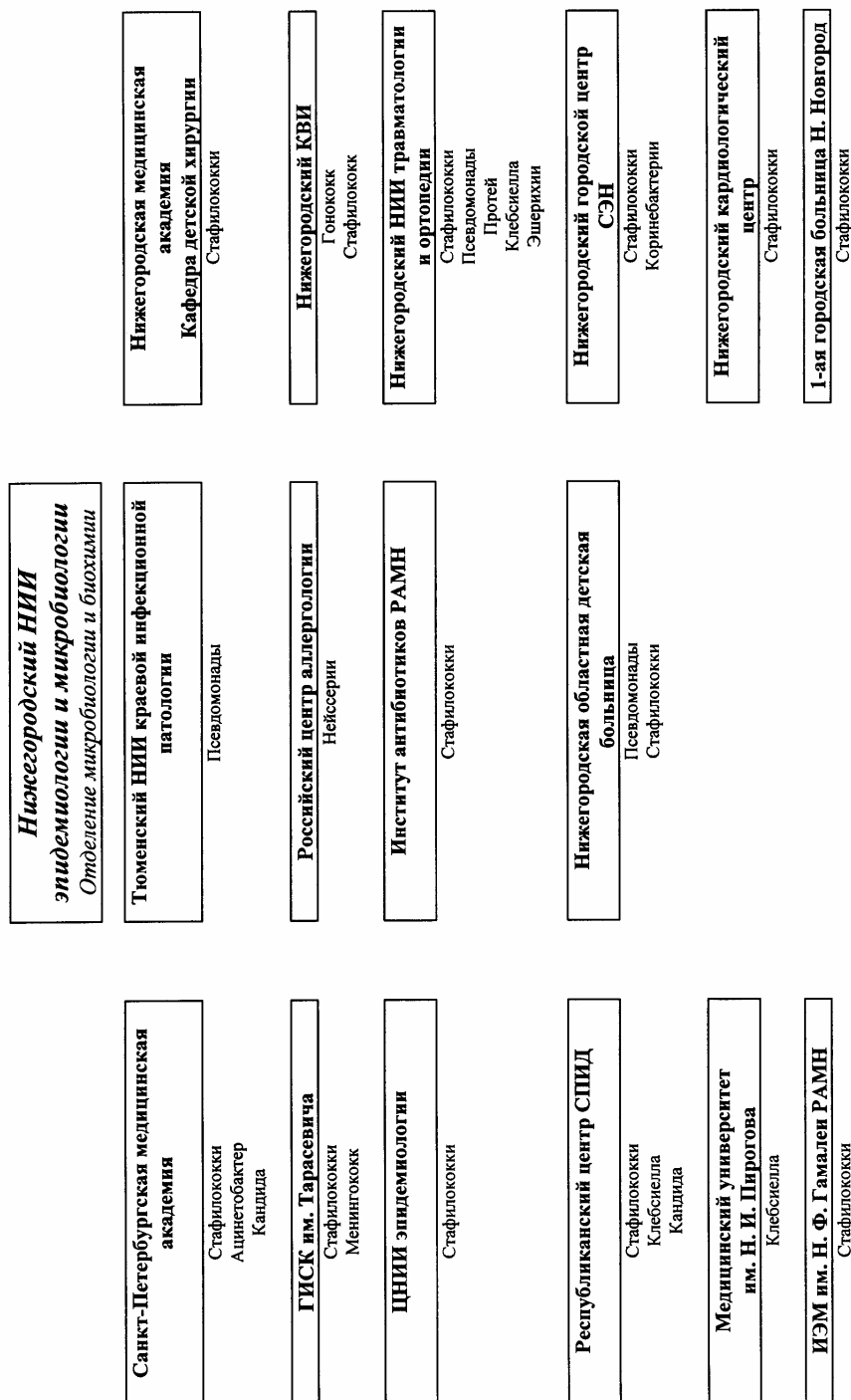


Рис. Совместная работа Нижегородского НИИЭМ с научными и практическими учреждениями России по электрофотиретипированию по белковым системам возбудителей инфекционных заболеваний

В 1974–1981 гг. был изучен состав высших жирных кислот патогенных, условно-патогенных и сапрофитных видов бактерий, выделенных от людей, животных и из внешней среды: энтеробактерий, энтерококков, вибрионов, микобактерий, нокардий, коринебактерий, лактобацилл, стафилококков, микрококков (Пинчук, Воронова, 1982). Особое внимание при этом уделялось тщательной идентификации свежевыделенных штаммов на основе традиционных схем по культурально-биохимическим методам типирования бактерий и сравнению их с эталонными культурами, полученными из ГИСК им. Л.А. Тарасевича и международных коллекций.

Масштаб различий в составе жирных кислот у изученных бактерий был неодинаков для таксонов одного и того же порядка.

Качественные различия на уровне рода были установлены для микобактерий, стафилококков, микрококков, энтерококков, гораздо менее ярко они были выражены у грамотрицательных бактерий. В этих случаях часто приходилось ограничиваться количественными тестами, причем за счет увеличения чувствительности аналитических методов и специальных математических приемов обработки результатов удалось использовать различия не только по основным, но и минорным компонентам спектров. Так, при изучении свободноэкстрагируемых липидов бактерий семейства *Vibrionaceae* высокоэффективным методом капиллярной газожидкостной хроматографии было установлено, что представители 4 родов дифференцировались по коэффициенту четности разветвленных кислот, который у бактерий рода *Vibrio* был равен 30–60, у *Veneckia* и *Plesiomonas* — не более 8, у *Aeromonas* — 0.09.

Состав липидов у микроорганизмов генетически дифференцирован, однако известно, что на показатели липидного метаболизма влияют многочисленные факторы окружающей среды. Колебания в содержании некоторых кислот в клетках бактерий связаны с физико-химическим состоянием (текучестью) липидов мембран и направленностью адаптационных процессов.

Поскольку газохроматографические спектры дают полную численную характеристику многокомпонентной системы, включающую 20–40 и более признаков, эти данные могут использоваться для нумерического анализа.

Таким образом, было установлено, что белковые системы бактерий могут демонстрировать уровни дифференциации бактерий. Внутривидовая дифференциация возбудителя на уровне штамма имеет большое значение в эпидемиологической практике.

Установлено, что спектры жирных кислот — объективный и надежный таксономический критерий. В ряде затруднительных случаев возможно получение достоверного ответа через сутки после выделения культуры. Перспективным является внедрение хроматографического метода при видовой идентификации микроорганизмов, систематическое положение которых неясно и спорно.

ЛИТЕРАТУРА

Дегтева Г.К., Беляева Е.В., Ермолина Г.Б. Белковые системы бактерий. Роль в таксономии и эпидемиологической практике. Н. Новгород, 1999.

Пинчук Л.М., Воронова Е.А. Изучение бактериальных жирных кислот в таксономических целях // Биохимия и биофизика микроорганизмов. Горький: Изд-во ГГУ им. Н.И. Лобачевского, 1982. С. 36–41.