

УДК 577.151.45 + 571.27

Скрининг бактериолитической активности интерлейкина-2 человека и лизоцима куриного яйца на клетках различных микроорганизмов

П. А. Левашов^{1*}, Е. Д. Овчинникова¹, О. А. Морозова², Д. А. Матолыгина¹, Е. Э. Осипова¹, Т. А. Чердынцева³, С. С. Савин¹, Г. С. Захарова^{1,4}, А. А. Алексеева^{1,4}, Н. Г. Белогурова¹, С. А. Смирнов¹, В. И. Тишков^{1,4*}, А. В. Левашов¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, межклиническая бактериологическая лаборатория, 119881, Москва, Б. Пироговская, 2, стр. 4

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра микробиологии, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

⁴Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр

«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33

*E-mail: levashov@yahoo.com, vitishkov@gmail.com

Поступила в редакцию 01.12.2015

Принята к печати 22.01.2016

РЕФЕРАТ Изучена бактериолитическая активность интерлейкина-2 и лизоцима куриного яйца в отношении 34 видов микроорганизмов. Установлено, что в присутствии интерлейкина-2 лизису подвергаются шесть видов из трех семейств: Enterobacteriaceae, Bacillaceae и Lactobacillaceae. Выявлено также 12 видов микроорганизмов, подверженных лизису в присутствии лизоцима, и 16 видов, лизируемых додецилсульфатом натрия (ДСН). Исследована рН-зависимость бактериолитической активности интерлейкина-2 и лизоцима в отношении разных клеток-субстратов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бактериолитическая активность, интерлейкин-2, лизоцим куриного яйца.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ДСН – додецилсульфат натрия; КОЕ – число колониеобразующих единиц.

ВВЕДЕНИЕ

Интерлейкин-2 (ИЛ-2) – один из важнейших регуляторов жизнедеятельности организма. Этот лимфокин участвует в регуляции таких процессов, как пролиферация и дифференцировка Т-лимфоцитов; увеличение цитолитической активности НК-клеток; пролиферация В-лимфоцитов, секреция иммуноглобулинов и др. Недавно нами было показано, что ИЛ-2 человека способен проявлять бактериолитическую активность [1–3]. В результате сравнительного тестирования на нескольких штаммах бактерий установлено, что ИЛ-2 имеет более узкую субстратную специфичность, чем лизоцим куриного яйца. ИЛ-2, как и лизоцим, способен лизировать клетки *Escherichia coli* и *Lactobacillus plantarum*, но, в отличие от лизоцима, не действует на клетки *Micrococcus luteus* и *Bacillus subtilis* [1–3]. Обнаружение активности интерлейкина-2 в отношении *E. coli* и *L. plantarum* оказалось

неожиданным. Механизм бактериолитического действия интерлейкина-2 на сегодняшний день не известен, для его выяснения необходимо изучить влияние интерлейкина-2 на другие виды бактерий. Поскольку интерлейкин-2 играет важную роль в развитии иммунного ответа, а также является лекарственным средством, то, в первую очередь, актуально проверить его действие на тех бактериях, которые часто контактируют с человеком, включая компоненты симбиотической микрофлоры. Основной задачей исследования стал скрининг бактериолитической активности интерлейкина-2 на микроорганизмах, которые встречаются на коже и слизистых человека, могут обнаруживаться в биоматериале раны. Для сравнения было решено на тех же микроорганизмах проверить действие лизоцима, а также изучить лизис клеток в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН), который входит в состав медицинских препаратов интерлейкина-2.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы следующие материалы: ронколейкин (раствор 0.25 мг/мл очищенного интерлейкина-2 для внутривенного и подкожного введения, «Биотех», Россия); MES, трис (“extra pure”, Amresco, США); лиофилизированный лизоцим куриного яйца (95% чистоты, Sigma Aldrich, США); NaOH (98% чистоты, AppliChem Panreac, Германия); CH_3COOH («ч. д. а.», «Реахим», Россия); HCl (Germed, Германия); 10% водный раствор ДСН (BioRad, США).

Выделенные из клинического материала (моча, мокрота, кал, раневое отделяемое и т.д.) штаммы микроорганизмов были любезно предоставлены Первым МГМУ им. И.М. Сеченова. Видовую принадлежность микроорганизмов определяли методом прямого белкового профилирования с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии (серия FLEX, Bruker Daltonic GmbH, Германия). В качестве среды для культивирования использовали твердую агаризованную среду – 5% кровяной колумбийский агар (Oxoid, Великобритания) pH 7.3. Культуру клеток выращивали в течение 24 ч при 35°C в атмосфере 5% CO_2 .

В работе также были использованы штаммы из музейной коллекции кафедры микробиологии МГУ им М.В. Ломоносова (обозначены как КМ МГУ). *L. acidophilus* КМ МГУ 146, *L. casei* КМ МГУ 153 и *Lactococcus lactis* КМ МГУ 165 выращивали на жидкой среде MRS при 37°C в анаэробных условиях [4]. *Clostridium butiricum* КМ МГУ 19 выращивали на среде следующего состава: глюкоза 10 г/л; пептон 10 г/л; K_2HPO_4 1 г/л; CaCO_3 5 г/л; вода водопроводная, при 37°C в анаэробных условиях [5]. *Alcaligenes faecalis* КМ МГУ 82, *B. megaterium* КМ МГУ 17, *B. mycoides* КМ МГУ 31, *B. cereus* КМ МГУ 9, *Pseudomonas aeruginosa* КМ МГУ 47, *P. fluorescens* КМ МГУ 71, *Serratia marcescens* КМ МГУ 208 и *Staphylococcus aureus* КМ МГУ 144 выращивали на мясо-пептонном бульоне при 30°C в аэробных условиях [6].

В работе использовали препарат лиофилизированных бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* («Микроген», Россия), из которого перед началом работы готовили суспензию (10 мл воды на одну ампулу). Предполагалось, что лиофилизированный препарат бактерий в эксперименте по измерению скорости лизиса мало отличается от свежесозревших клеток по аналогии с препаратом лиофилизированных клеток *L. plantarum* [7].

Препарат клеток *Thermus aquaticus* любезно предоставлен А.А. Белогуровым. Клетки выращивали по стандартной для данной культуры методике при температуре 75°C в аэробных условиях [8].

Перед началом измерений все препараты бактериальных клеток центрифугировали при 3500 об/мин

в течение 4 мин на центрифуге Minispin (Eppendorf, Германия), затем ресуспендировали в буферном растворе, используемом для измерения активности. Раствор лизоцима куриного яйца готовили непосредственно перед экспериментом, используя тот же буферный раствор, что и для измерения активности. В качестве стандартного раствора интерлейкина-2 использовали готовый препарат без дополнительной обработки, ампулу вскрывали непосредственно перед экспериментом. Поскольку в исходном растворе интерлейкина-2 присутствует ДСН (2.5 мг/мл), проведены эксперименты по влиянию данного компонента на фоновый лизис клеток. Для определения изменений поглощения при лизисе клеток использовали двухлучевые спектрофотометры UV-1800 или UV-1601PC (Shimadzu, Япония). Измерения проводили в кюветах с длиной оптического пути 1 см объемом 0.5 мл.

Бактериолитическую активность определяли турбидиметрически по скорости падения поглощения суспензии клеток [7, 9] при длине волны 650 нм и температуре 37°C. В качестве начальной скорости лизиса клеток использовали изменение поглощения (A_{650}) в интервале времени от 5 до 20–30 с от начала реакции. Если в условиях эксперимента наблюдался фоновый самопроизвольный лизис клеток в отсутствие бактериолитических факторов, то его величину вычитали из значения активности в присутствии бактериолитических добавок. В случае лизиса клеток в присутствии ДСН учитывали также поправку на величину скорости лизиса в присутствии интерлейкина-2 соответственно содержанию ДСН в пробе. При определении скорости лизиса использовали суспензию клеток с начальным поглощением $A_{650} = 0.4$. Активность измеряли в буферном растворе 10 mM MES-трис- CH_3COOH при разных значениях pH. В качестве условного показателя активности приведены значения начального изменения поглощения $-dA/dt$ (ед. погл./мин), которые (с соответствующими для различных клеток коэффициентами) пропорциональны скоростям изменения числа живых клеток или колониеобразующих единиц ($-d\text{КОЕ}/dt$), соответственно пропорциональны изменениям степени лизиса $d\Theta/dt$ ($\Theta = 0$, если все клетки целы, и $\Theta = 1$ в случае 100% разрушения клеток препарата) [7, 9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице приведены данные о воздействии интерлейкина-2, лизоцима и ДСН на клетки 37 штаммов 34 различных видов бактерий. Как видим, 12 видов бактерий подвержены лизису в присутствии лизоцима, 16 лизируются в присутствии ДСН и только шесть видов чувствительны к интерлейкину-2: *L. acidophilus*, *B. megaterium* (подтверж-

Лизис бактерий в присутствии интерлейкина-2, лизоцима и додецилсульфата натрия (ДСН)

№	Микроорганизм	Скорость лизиса в присутствии добавки		
		лизоцим	интерлейкин-2	ДСН
1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	0	0
2	<i>Alcaligenes faecalis</i> КМ МГУ 82	3.2/2.0/6.4	0	1.1/100/8.0
3	<i>Bacillus megaterium</i>	5.2/0.8/8.7	6.1/15/8.7	0
4	<i>Bacillus megaterium</i> КМ МГУ 17	2.2/2.0/8.5	2.6/30/8.5	0
5	<i>Bacillus mycoides</i> КМ МГУ 31	4.5/4.0/8.0	3.6/10/8.0	0.7/100/8.0
6	<i>Bacillus cereus</i> КМ МГУ 9	4.5/4.0/8.5	0.9/30/8.5	0
7	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	0	0	0
8	<i>Citrobacter braakii</i>	0	0	0
9	<i>Clostridium butyricum</i> КМ МГУ 19	0	0	2.5/400/8.0
10	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	0	0	0
11	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	7.8/2.0/6.4	0
12	<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0.9/200/8.0
13	<i>Enterobacter faecalis</i>	0	0	1.9/50/8.0
14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	0
15	<i>Lactobacillus acidophilus</i> КМ МГУ 146	3.2/0.8/7.0	2.9/5.0/7.0	2.4/50/8.0
16	<i>Lactobacillus casei</i> КМ МГУ 153	0	0	0
17	<i>Lactococcus lactis</i> КМ МГУ 165	0	0	0
18	<i>Morganella morganii</i>	0	0	2.0/40/8.0
19	<i>Neisseria perflava</i>	0	0	0
20	<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	2.9/50/8.0
21	<i>Proteus vulgaris</i>	3.6/2.0/8.7	0	2.2/60/8.0
22	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4.2/0.2/8.7	0	5.8/50/8.0
23	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> КМ МГУ 47	7.3/0.4/7.7	0	1.1/100/8.0
24	<i>Pseudomonas fluorescens</i> КМ МГУ 71	3.5/0.5/8.4	0	0
25	<i>P. putida</i>	0	0	2.5/200/8.0
26	<i>Rothia mucilaginosa</i>	0	0	0
27	<i>Serratia marcescens</i> КМ МГУ 208	3.7/0.2/8.4	4.7/30/8.0	0
28	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	6.2/50/8.0
29	<i>Staphylococcus aureus</i> КМ МГУ 144	1.6/1.0/7.7	0	0
30	<i>Staphylococcus capitis</i>	0	0	0
31	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0
32	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1.4/0.4/8.7	0	4.9/20/8.0
33	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	0	0
34	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	0	3.3/150/8.0
35	<i>Streptococcus agalactiae</i>	4.6/5.0/7.0	0	4.1/50/8.0
36	<i>Streptococcus pyogenes</i>	0	0	0
37	<i>Thermus aquaticus</i>	0	0	3.6/125/8.

Примечание. Значения скоростей лизиса даны в виде X/Y/Z, где X – скорость лизиса, ед. погл., $10^{-3} \times \text{мин}^{-1}$, Y – концентрация добавки, мкг $\times \text{мл}^{-1}$ и Z – pH среды, при котором проводили измерения. Для лизоцима и интерлейкина-2 даны оптимальные значения pH, для ДСН все значения скорости получены при pH 8.0. Нули означают, что вплоть до концентраций лизоцима 5 мкг/мл, интерлейкина-2 – 50 мкг/мл и для ДСН – 0.5 мг/мл не наблюдалось изменений поглощения в течение 3 мин.

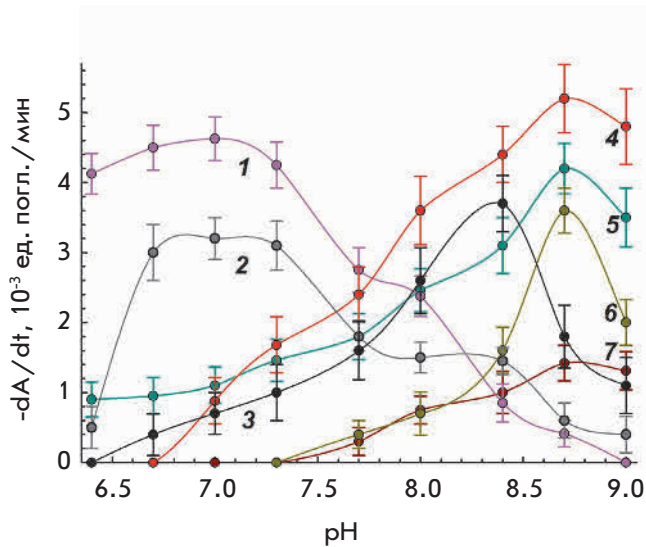


Рис. 1. Зависимость скорости лизиса клеток от рН в присутствии лизоцима. 1 – *Streptococcus agalactiae*, лизоцим 5.0 мкг /мл. 2 – *Lactobacillus acidophilus* КМ МГУ 146, лизоцим 0.8 мкг /мл. 3 – *Serratia marcescens* КМ МГУ 208, лизоцим 0.2 мкг /мл. 4 – *Bacillus megaterium*, лизоцим 0.8 мкг /мл. 5 – *Pseudomonas aeruginosa*, лизоцим 0.2 мкг /мл. 6 – *Proteus vulgaris*, лизоцим 2.0 мкг /мл. 7 – *Staphylococcus haemolyticus*, лизоцим 0.4 мкг /мл

дено для двух штаммов данного вида), *B. mycoides*, *B. cereus*, *S. marcescens* и *Enterobacter aerogenes*. При этом на клетки *L. acidophilus* и *B. mycoides* действуют и лизоцим, и интерлейкин-2, и ДСН. На клетки *B. megaterium*, *B. cereus* и *S. marcescens* действуют лизоцим и интерлейкин-2, но не ДСН. На *Ent. aerogenes* действует только интерлейкин-2. В целом, спектры микроорганизмов, на которые действует лизоцим и интерлейкин-2, не совпадают, хоть и имеют пересечение. Вероятно, механизм действия лизоцима и интерлейкина-2 в значительной степени различается.

На рис. 1 и 2 представлены рН-зависимости скорости лизиса клеток лизоцимом и интерлейкином-2. Видно, что значения рН-оптимума активности интерлейкина-2 и лизоцима в отношении клеток *B. megaterium* совпадают и составляют 8.7. В случае клеток *L. acidophilus* рН-оптимумы активности лизоцима и интерлейкина-2 также сходны (6.5–7.0 и 6.7–7.3). Оптимумы активности лизоцима и интерлейкина-2 близки и в случае *B. mycoides*, и *B. cereus* (на графиках зависимости не представлены из-за сходства с зависимостями для *B. megaterium*). Явление схожего смещения оптимумов активности лизоцима и интерлейкина-2, зависящего от выбора субстрата – вида бактерий, наблюдали также в случае клеток *E. coli* и *L. plantarum* [3].

На рис. 3 представлена рН-зависимость скорости лизиса клеток в присутствии ДСН. На графике приведены данные только для пяти из 16 микроорганизмов, чувствительных к ДСН. У остальных 11 микроорганизмов зависимости скорости лизиса от рН в присутствии ДСН имеют аналогичный вид. Как видим, ДСН лучше действует на клетки в щелочной среде, что присуще самым различным микроорганизмам. Действие ДСН обнаруживается при рН выше 7.3–8.0. Возможно, что подобный характер рН-зависимости каким-то образом связан с диапазоном значений рК фосфатных групп фосфолипидов клеточных мембран. Вполне вероятно также, что на характер рН-зависимости могут влиять и компоненты буферной смеси, например, трис. Выяснение точной молекулярной причины подобной зависимости действия ДСН от рН выходит за рамки нашей работы.

Интерлейкин-2 действует на отдельных представителях грамотрицательного семейства Enterobacteriaceae, в том числе на *Ent. aerogenes* и *S. marcescens*, что показано в нашей работе, а также, как установлено ранее, на *E. coli* [1–3]. Интерлейкин-2 активен в отношении таких грамположительных представителей семейства Lactobacillaceae, как *L. acidophilus* (данная работа) и *L. plantarum* [3]. Обнаружено также, что интерлейкин-2 действует на *B. megaterium*, *B. mycoides*

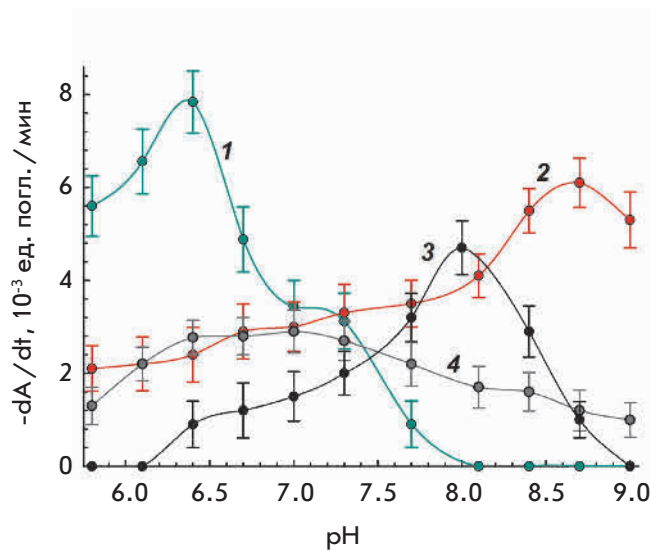


Рис. 2. Зависимость скорости лизиса клеток от рН в присутствии интерлейкина-2. 1 – *Enterobacter aerogenes*, интерлейкин-2 2.0 мкг /мл. 2 – *Bacillus megaterium*, интерлейкин-2 15 мкг /мл. 3 – *Serratia marcescens* КМ МГУ 208, интерлейкин-2 30 мкг /мл. 4 – *Lactobacillus acidophilus* КМ МГУ 146, интерлейкин-2 5.0 мкг /мл

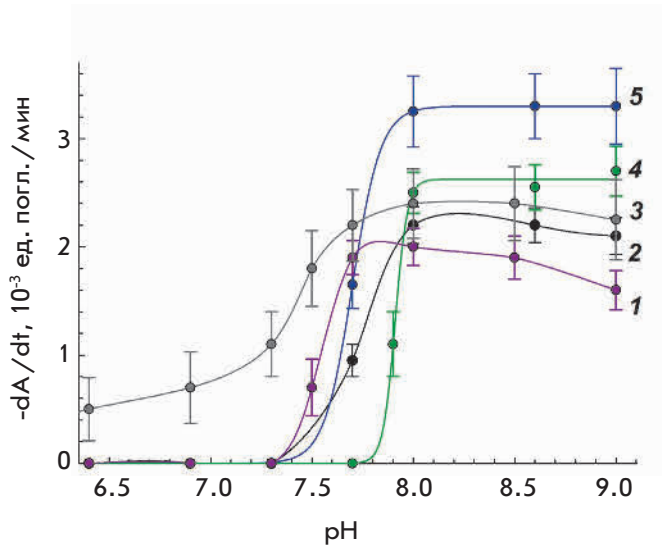


Рис. 3. Зависимость скорости лизиса клеток от pH в присутствии ДСН. 1 – *Morganella morganii*, ДСН 40 мкг/мл. 2 – *Proteus vulgaris*, ДСН 60 мкг/мл. 3 – *Lactobacillus acidophilus* КМ МГУ 146, ДСН 50 мкг/мл. 4 – *Pseudomonas putida*, ДСН 0.2 мг/мл. 5 – *Stenotrophomonas maltophilia* ДСН 0.15 мг/мл

и *V. cereus* – грамположительные спорообразующие палочки семейства *Vacillaceae*, которые отличаются по строению и составу клеточной стенки как от бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, так и от *Lactobacillaceae*. Можно предположить, что в клеточной стенке *E. coli*, *Ent. aerogenes*, *S. marcescens*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *B. mycoides*, *V. megaterium* и *V. cereus* есть некие схожие структуры. Действительно, в клеточной стенке *V. megaterium*, *V. cereus* и *L. plantarum* обнаружены структуры, содержащие диаминопимелиновую кислоту [10–13], что не характерно для многих грамположительных микроорганизмов, но достаточно распространено у представителей семейства *Enterobacteriaceae* [13, 14]. Считается, что клеточная стенка *L. acidophilus* не содержит значительных количеств диаминопимелиновой кислоты [15]. Однако по аналогии с *L. plantarum* мы можем предположить, что диаминопимелиновая кислота может входить в состав клеточной стенки отдельных штаммов *L. acidophilus*. Нами не обнаружены публикации, в которых приведены точные данные о присутствии и количестве диаминопимелиновой кислоты у *B. mycoides*, однако мы можем предполагать, что строение клеточной стенки у этой бактерии

и у *V. megaterium* и *V. cereus* может быть частично схожим. По-видимому, сходную восприимчивость к интерлейкину-2 у столь неродственных микроорганизмов можно объяснить наличием общих структур, содержащих диаминопимелиновую кислоту. Ранее мы показали, что интерлейкин-2 не действует на клетки *V. subtilis* [1, 2], которые также входят в семейство *Vacillaceae*. Однако опубликованы сведения, согласно которым у *V. subtilis*, в отличие от многих других представителей этого семейства, диаминопимелиновая кислота находится в амидированной форме [16]. Таким образом, устойчивость *V. subtilis* к действию интерлейкина-2 фактически подтверждает нашу гипотезу. В целом, на данном этапе исследования преждевременно делать точные выводы о том, какие типы микроорганизмов чувствительны к интерлейкину-2. Кроме того, чувствительность к бактериолитическим агентам может изменяться в зависимости от наличия и состава капсулы у бактерии, а также различаться даже у разных штаммов одного и того же вида [17]. Следует отметить, что продолжают дискуссии относительно механизмов действия даже давно изучаемого лизоцима на различные микроорганизмы. Есть основания полагать, что лизоцим может действовать на бактериальные клетки не только как фермент, но и как антибактериальный катионный белок [18]. В результате нашей работы установлен некий спектр микроорганизмов, чувствительных к интерлейкину-2, что поможет дальнейшему изучению молекулярных механизмов восприимчивости или невосприимчивости микроорганизмов к данному бактериолитическому фактору. ●

Авторы выражают благодарность сотрудникам Межклинической бактериологической лаборатории Первого МГМУ им. И.М. Сеченова за предоставленную возможность культивирования микроорганизмов и определения их видовой принадлежности. Авторы также выражают благодарность сотрудникам кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова за предоставленную возможность работы с микроорганизмами музейной коллекции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 15-14-00012).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Левашов П.А., Седов С.А., Белогурова Н.Г., Шиповсков С.В., Левашов А.В. // Биохимия. 2012. Т. 77. № 11. С. 1567–1570.
2. Седов С.А., Белогурова Н.Г., Шиповсков С.В., Семёнова М.В., Гитинов М.М., Левашов А.В., Левашов П.А. // Биоорганической химии. 2012. Т. 38. № 3. С. 315–323.
3. Левашов П.А., Матоглыгина Д.А., Осипова Е.Э., Савин С.С., Захарова Г.С., Гасанова Д.А., Белогурова Н.Г., Овчинникова Е.Д., Смирнов С.А., Тишков В.И., Левашов А.В. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2015. Т. 56. № 6. С. 359–364.
4. de Man J.D., Rogosa M., Sharpe M.E. // J. Appl. Bacteriol. 1960. V. 23. P. 130–135.
5. Галынкин В.А., Заикина Н.А., Кочеровец В.И., Курбанова И.З. Питательные среды для микробиологического контроля качества лекарственных средств и пищевых продуктов. СПб.: Проспект науки, 2006. 304 с.
6. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005. 608 с.
7. Матоглыгина Д.А., Осипова Е.Э., Смирнов С.А., Белогурова Н.Г., Еремеев Н.Л., Тишков В.И., Левашов А.В., Левашов П.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2015. Т. 56. № 6. С. 365–371.
8. Brock T.D., Edwards M.R. // J. Bacteriol. 1970. V. 104. P. 509–517.
9. Levashov P.A., Sedov S.A., Shipovskov S., Belogurova N.G., Levashov A.V. // Anal. Chem. 2010. V. 82. P. 2161–2163.
10. Bricas E., Ghuysen J.-M., Dezelée P. // Biochemistry. 1967. V. 6. № 8. P. 2598–2607.
11. Okada S., Suzuki Y., Kozaki M. // J. Gen. Appl. Microbiol. 1979. V. 25. P. 215–221.
12. van Heijenoort J., Elbaz L., Dezelee P., Petit J.F., Bricas E., Ghuysen J.M. // Biochemistry. 1969. V. 8. № 1. P. 207–213.
13. Day A., White P.J. // Biochem J. 1977. V. 161. № 3. P. 677–685.
14. Berges D.A., DeWolf W.E. Jr., Dunn G.L., Grappel S.F., Newman D.J., Taggart J.J., Gilvarg C. // J. Med. Chem. 1986. V. 29. № 1. P. 89–95.
15. Ikawa M., Snell E.E. // J. Biol. Chem. 1960. V. 235. P. 1376–1382.
16. Warth A.D., Strominger J.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1969. V. 64. № 2. P. 528–535.
17. Campos M.A., Vargas M.A., Regueiro V., Llompарт C.M., Albertí S., Bengoechea J.A. // Infection Immunity. 2004. V. 72. № 12. P. 7107–7114.
18. Ginsburg A., Koren E., Feuerstein O. // SOJ Microbiol. Infect. Dis. 2015. V. 3. № 1. P. 1–8.