

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology

Бактериология · том 7 · №4 · 2022



2022 • ТОМ 7 • №4

ISSN 2500-1027

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Научно - практический журнал

Главный редактор

И.А.Дятлов, академик РАН, д.м.н., профессор
(Россия)

Ответственный секретарь

И.Г.Говорунов, к.б.н.
(Россия)

Редакционный совет

А.П.Анисимов, д.м.н., проф. (Россия)
С.В.Балахонов, д.м.н., проф. (Россия)
А.Н.Куличенко, академик РАН, д.м.н., проф. (Россия)
В.В.Кутырев, академик РАН, д.м.н., проф. (Россия)
Н.В.Рудаков, д.м.н., проф. (Россия)
Сун Чжичжоу, к.б.н. (Китай)

Редколлегия

З.Адъяасурэн, к.м.н. (Монголия)	С.Г.Марданлы, д.м.н. (Россия)
И.А.Базиков, д.м.н., проф. (Россия)	Т.В.Мека-Меченко, д.м.н. (Казахстан)
В.А.Горбунов, к.м.н. (Белоруссия)	В.Л.Мотин, к.б.н., проф. (США)
С.В.Дентовская, д.м.н. (Россия)	Т.В.Припутневич, член-корр. РАН, д.м.н. (Россия)
Л.В.Домотенко, к.х.н. (Россия)	А.Ракин, к.м.н. (Германия)
Г.А.Каримова, к.б.н. (Франция)	Э.А.Светоч, д.в.н., проф. (Россия)
А.В.Карлышев, к.х.н., проф. (Англия)	В.Н.Царев, д.м.н., проф. (Россия)
Л.В.Коломбет, д.б.н. (Россия)	Л.Н.Черноусова, д.б.н., проф. (Россия)
М.Косой, к.б.н. (США)	К.Ю.Шаталин, к.б.н. (США)
Ш.Х.О.Курбанов, к.м.н. (Азербайджан)	И.Г.Шемякин, д.б.н., проф. (Россия)
И.Х.Маматкулов, д.м.н., проф. (Узбекистан)	

Учредитель

© Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Адрес учредителя и редакции:

142279, Московская область,
г.о. Серпухов, р.п. Оболенск,
Территория «Квартал А», д. 24,
ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: +7-4967-360003
+7-4967-360046
Факс: +7-4967-360010

E-mail: bacteriology@obolensk.org
info@obolensk.org

Издатель

© «Издательство «Династия»



www.phdynasty.ru

117149, Москва, ул. Азовская, д. 6, корп. 3

Подписано в печать 28.12.2022 г.

Отпечатано: Мастерская печати Old School,
603105, Нижний Новгород, ул. Чачиной, 39а, оф. 5

Журнал зарегистрирован
Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)
Регистрационный номер
ПИ №ФС 77-66792 от 15.08.2016 г.

Журнал «Бактериология»
является рецензируемым изданием.

Выходит четыре раза в год.
Основан в 2016 году.

Редакция не несет ответственности
за содержание рекламных материалов.

Тираж 1530 экз. Цена свободная.

Отдел рекламы:
Телефон: +7 495 660-6004
E-mail: reklama@phdynasty.ru

Подписной индекс по объединенному
каталогу «Пресса России»: 39920

Колонка главного редактора

Современные технологические платформы для разработки вакцин против опасных бактериальных инфекций (часть II)	5
--	---

Экспериментальные статьи

Генетическое разнообразие и патогенный потенциал <i>Legionella pneumophila</i> , выделенных на отдельных территориях Российской Федерации Э.А.Светоч, Н.К.Фурсова, Е.И.Асташкин, Б.В.Ерусланов, И.П.Мицевич, Н.Н.Карцев, А.В.Попова, О.В.Коробова, И.А.Дятлов	10
Протекторное действие супернатантов лизатов реликтовых бактерий <i>Bacillus</i> sp. из вечной мерзлоты на ДНК лейкоцитов крови лабораторных мышей (посвящается памяти Потапова В.Д.) М.В.Аверин, М.Б.Бородулин, А.Б.Гапеев, Г.И.Грива, Н.С.Захарченко, С.Г.Игнатов, В.П.Мельников, В.Д.Потапов, Е.Б.Рукавцова, Р.Н.Храмов, Т.Г.Щербатюк, А.В.Брушков	24
Получение рекомбинантных антигенов вируса SARS-CoV-2 в различных системах экспрессии Е.А.Панферцев, Т.В.Решетняк, А.А.Горбатов, П.В.Соловьев, Т.В.Федоров, Т.Э.Светоч, Е.В.Баранова, С.Ф.Бикетов	34
Частота обнаружения грибов рода <i>Candida</i> при хроническом тонзиллите у детей Г.М.Одилова	40
Мышиная модель пищевой листериозной инфекции, вызываемая <i>Listeria monocytogenes</i> А.И.Борзилов, О.В.Коробова, Т.И.Комбарова, Е.С.Перескокова, Е.А.Ганина	44
Определение бактерий туляремии в образцах окружающей среды с помощью сочетания иммуномагнитной сепарации и изотермической амплификации А.Г.Шевяков, И.В.Щит, С.С.Ветчинин, Р.И.Миронова, С.Г.Игнатов, С.Ф.Бикетов	57
Опыт применения отечественных питательных сред при выделении сальмонелл из кормов и биологического материала животных А.А.Кремлева, О.В.Полосенко, Л.В.Домотенко	61
Сравнительная оценка антибактериальной эффективности рифабутина и комбинации рифабутина с 4-гексилрезорцином в отношении антибиотикорезистентных <i>Mycobacterium tuberculosis in vitro</i> О.Ю.Манзенюк, Ю.А.Николаев, Т.Н.Мухина, В.В.Фирстова, Э.И.Кязимов, И.Г.Шемякин	66

Обзорные статьи

Перспективы разработки тест-систем, выявляющих патогенные микроорганизмы и белковые токсины с максимальными показателями экспрессности, чувствительности и специфичности С.Г.Игнатов, И.Ю.Щит, Е.В.Баранова, А.Г.Волошин, С.Ф.Бикетов	69
Потенциал повышения чувствительности определения патогенов при сочетании магнитофоретической хроматографии и изотермической амплификации нуклеиновых кислот С.Г.Игнатов, А.Г.Волошин, С.Ф.Бикетов	74
Методы диагностики малярии И.Ю.Щит, С.Ф.Бикетов	79

Проблемная статья

Экспертиза противотуберкулезных лечебных и санаторно-курортных учреждений при реперофилировании Е.А.Тюрин, И.П.Мицевич, С.А.Благодатских, М.В.Храмов	85
---	----

Материалы VII Национального конгресса бактериологов (дополнение)	90
--	----

Правила оформления статей (основные положения)	96
--	----

BACTERIOLOGY

Scientific and Practical Journal

Editor-in-Chief

I.A.Dyatlov, academician of RAS
(Russia)

Executive Secretary

I.G.Govorunov, PhD
(Russia)

Editorial Council

A.P.Anisimov, Sc.D., prof. (Russia)
S.V.Balakhonov, Sc.D., prof. (Russia)
A.N.Kulichenko, academician of RAS, Sc.D., prof. (Russia)
V.V.Kutyrev, academician of RAS, Sc.D., prof. (Russia)
N.V.Rudakov, Sc.D., prof. (Russia)
Sun Chzhichzhou, PhD (China)

Editorial Board

Z.Adyaasyren , PhD (Mongolia)	I.Kh.Mamatkulov, Sc.D., prof. (Uzbekistan)
I.A.Bazikov, Sc.D., prof. (Russia)	S.G.Mardanly, Sc.D. (Russia)
L.N.Chernousova, Sc.D., prof. (Russia)	T.V.Meka-Mechenko, Sc.D. (Kazakhstan)
S.V.Dentovskaya, Sc.D. (Russia)	V.L.Motin, PhD, prof. (USA)
L.V.Domotenko, PhD (Russia)	T.V.Priputnevich, corr.member of RAS, ScD (Russia)
V.A.Gorbunov, PhD (Belarus)	A.Rakin, PhD (Germany)
G.A.Karimova, PhD (France)	K.Yu.Shatalin, PhD (USA)
A.V.Karlyshev, PhD, prof. (England)	I.G.Shemyakin, Sc.D., prof. (Russia)
L.V.Kolombet, Sc.D. (Russia)	E.A.Svetoch, Sc.D., prof. (Russia)
M.Kosoi, PhD (USA)	V.N.Tsarev, Sc.D., prof. (Russia)
Sh.Kh.O.Kurbanov, PhD (Azerbaijan)	

Founder and Publisher

© State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Editorial Office:

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Obolensk, Moscow region, 142279
Phone: +7-4967-360003, +7-4967-360046
Fax: +7-4967-360010
E-mail: bacteriology@obolensk.org
info@obolensk.org

Publisher

© «Dynasty» Publishing House



www.phdynasty.ru

Advertising Department:

Phone: +7 495 660 6004; e-mail: reklama@phdynasty.ru

Editor-in-Chief's Introduction

Modern technological platforms for the development of vaccines against dangerous bacterial infections (Part II)	5
---	---

Experimental Articles

Genetic diversity and pathogenic potential of <i>Legionella pneumophila</i> isolated in certain territories of Russian Federation <i>E.A.Svetoch, N.K.Fursova, E.I.Astashkin, B.V.Yeruslanov, I.P.Mitsevich, N.N.Kartsev, A.V.Popova, O.V.Korobova, I.A.Dyatlov</i>	10
Protective action of supernatant lysates of relict bacteria <i>Bacillus</i> sp. from permafrost on the blood leukocytes DNA of laboratory mice (dedicated to the memory of Potapov V.D.) <i>M.V.Averin, M.B.Borodulin, A.B.Gapeev, G.I.Griva, N.S.Zakharchenko, S.G.Ignatov, V.P.Melnikov, V.D.Potapov, E.B.Rukavtsova, R.N.Khramov, T.G.Shcherbatyuk, A.V.Brouchkov</i>	24
Obtaining recombinant antigens of the SARS-CoV-2 virus in various expression systems <i>E.A.Panfertsev, T.V.Reshetnyak, A.A.Gorbatov, P.V.Soloviev, T.V.Fedorov, T.E.Svetoch, E.V.Baranova, S.F.Biketov</i>	34
The frequency of detection of <i>Candida</i> fungi in chronic tonsillitis in children <i>G.M.Odilova</i>	40
Mouse model of nutritional listeria infection caused by <i>Listeria monocytogenes</i> <i>A.I.Borzilov, O.V.Korobova, T.I.Kombarova, E.S.Pereskokova, E.A.Ganina</i>	44
Detection of tularemia bacteria in environmental samples using a combination of immunomagnetic separation and isothermal amplification <i>A.G.Shevyakov, I.Yu.Shchit, S.S.Vetchinin, R.I.Mironova, S.G.Ignatov, S.F.Biketov</i>	57
Experience of using domestic nutrient media to isolate salmonella from animal feed and biological material <i>A.A.Kremleva, O.V.Polosenko, L.V.Domotenko</i>	61
Comparative evaluation of the antibacterial effectiveness of rifabutin and a combination of rifabutin with 4-hexylresorcin against antibiotic-resistant <i>Mycobacterium tuberculosis in vitro</i> <i>O.Yu.Manzenyuk, Yu.A.Nikolaev, T.N.Mukhina, V.V.Firstova, E.I.Kazimov, I.G.Shemyakin</i>	66

Review Articles

Prospects for the development of test systems that detect pathogenic microorganisms and protein toxins with maximum rates of rapidity, sensitivity and specificity <i>S.G.Ignatov, I.Yu.Shchit, E.V.Baranova, A.G.Voloshin, S.F.Biketov</i>	69
Sensitivity potential for pathogen detection by combining magnetophoretic chromatography and isothermal nucleic acid amplification <i>S.G.Ignatov, A.G.Voloshin, S.F.Biketov</i>	74
Methods of malaria diagnostics <i>I.Yu.Shchit, S.F.Biketov</i>	79

Проблемная статья

Examination of anti-tuberculosis medical and sanatorium and resort institutions when reprofiling <i>E.A.Tyurin, I.P.Mitsevich, S.A.Blagodatskikh, M.V.Khramov</i>	85
--	----

Proceedings of the VII National Congress of Bacteriologists (supplement)	90
--	----

Instructions for Authors	96
------------------------------------	----

Современные технологические платформы для разработки вакцин против опасных бактериальных инфекций (часть II)*

Одной из целей федерального проекта «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья» является создание технологических платформ для быстрой разработки вакцинных препаратов против вновь возникающих и возвращающихся бактериальных инфекций.

Для ускорения процессов разработки предложена технология модульных вакцин (вакцинных платформ). Технология опирается на предварительно создаваемый «конструктор», включающий базовые носители (платформы) на основе прототипов уже известных патогенов и модульные антигены. Наличие таких заранее приготовленных «конструкторов», чьи базовые носители и модульные антигены успешно прошли фазу II клинических испытаний, может способствовать ускорению разветвления их производства.



Предлагаемый ФБУН ГНЦ ПМБ комплексный алгоритм ускоренной разработки и выпуска на коммерческий рынок бактериальных модульных вакцин против эмерджентных бактериальных инфекций с пандемическим потенциалом включает четыре взаимодополняющих технологических тренда (платформы):

- 1) вакцины на основе «бактериальных теней» или везикул наружной мембраны;
- 2) живые прецизионно аттенуированные вакцины для преимущественно первичной иммунизации на основе штаммов бактерий с геномами, отредактированными для снижения токсигенности и аллергенности, а также векторные рекомбинантные вакцины;
- 3) субъединичные полисахаридные вакцины;
- 4) субъединичные белковые, в том числе микрокапсулированные, вакцины.

Для ускоренного создания конечных продуктов, разрабатываемых в рамках проекта, а также продуктов, которые будут созданы для решения проблем биологической безопасности в конкретных эпидемиологических условиях, необходимо наличие пилотной линии, позволяющей в экспериментально-производственных условиях реализовать все четыре платформы разработки вакцинных препаратов. Это позволит в кратчайшие сроки оценить эффективность биотехнологических процессов получения вакцин, включая стабильность продуцентов, эффективность синтеза целевых продуктов, стабильность компонентов на стадии формирования готовой лекарственной формы.

Для ускоренного испытания разработанных прототипов вакцинных препаратов и их компонентов в условиях острых опытов с высококонтагиозными патогенами необходимы помещения с условиями высшей степени биологической защищенности (BSL-4) с испытательными стендами, позволяющими проводить исследования по вакцинации, заражению, лечению всех видов лабораторных животных (включая обезьян), в том числе в условиях использования аэрозолей. Наличие такого комплекса позволит в безопасных условиях оценить разработанные препараты, что особенно актуально при создании средств специфической профилактики против принципиально новых возбудителей и патогенных биологических агентов, отличающихся повышенной вирулентностью и контагиозностью.

*Часть I опубликована в журнале «Бактериология» 2022; 7(2): 5-7.

Обоснование платформы «Вакцины на основе «бактериальных теней» и/или везикул наружной мембраны»

«Бактериальные тени» (БТ) представляют собой неповрежденные клеточные стенки грам-отрицательных бактерий, не содержащие цитоплазмы и ее составляющих, сохраняющие трехмерную клеточную структуру исходного микроба и образующиеся под воздействием формирующего в клеточной стенке тоннели белка E бактериофага φX174 или других щадящих биологических или химических факторов, ведущих к истечению из клетки цитоплазматического содержимого. Разработанные как альтернативно инактивированные вакцины с повышенной безопасностью, БТ могут быть использованы и в качестве эффективных носителей, способных одновременно повышать иммуногенность нескольких интактных антигенов.

На сегодняшний день БТ успешно получены на моделях *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Pectobacterium cypripedii*, *Helicobacter pylori*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Brucella*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pestis*.

Создание набора «литических» плазмид подразумевает конструирование способных реплицироваться в выбранном микроорганизме в небольшом количестве копий на клетку плазмидных векторов, несущих промоторы со строгим контролем индукции в данном микроорганизме и кассеты генов литических белков бактериофагов (гена белка E фага φX174, генов белков S, R и Rz фага λ и т.п.) Векторы, используемые для этих целей, должны быть построены модульным способом, чтобы обеспечить будущие адаптации.

Схема производства бактериальных теней состоит из ряда стадий:

- посев стартовой культуры,
- посев культуры в ферментер,
- выращивание культуры до экспоненциальной стадии роста,
- индукция лизиса культуры,
- индукция гена неспецифической нуклеазы для расщепления нуклеиновых кислот (дополнительная инактивация выживших клеток, удаление нуклеиновых кислот для предотвращения рекомбинации, снижение вязкости культуры),
- сбор и концентрирование лизированной культуры,
- инактивация следовых количеств жизнеспособных клеток обработкой антибиотиком или β-пропиолактоном,
- отмывка бактериальных теней от компонентов среды, цитоплазматического содержимого и инактивирующих агентов. Концентрирование препарата бактериальных теней.
- контроль отсутствия в препарате нуклеиновых кислот,
- добавление дополнительных компонентов (антигены, адъюванты, криопротекторы, стабилизаторы и т.п.),
- фасовка и лиофилизация готового вакцинного препарата,
- заключительный контроль на стерильность и способность к суспендированию.

Этапами непосредственной разработки кандидатной вакцины в рамках технологического тренда «везикулы внешней мембраны» являются:

- полногеномное секвенирование нового возбудителя;
- определение таксономической принадлежности нового возбудителя. Определение методами обратной вакцинологии предположительных протективных антигенов, факторов патогенности и аллергенов данного возбудителя;
- оптимизация везикулообразования на модели прототипа нового патогена методами редактирования генома;
- отработка условий культивирования, обеспечивающих максимальный выход везикул;
- отработка условий инактивации следовых количеств жизнеспособных клеток;
- отработка условий конъюгирования модульных протективных антигенов с носителем – везикулами аттенуированного прототипного патогена;
- отработка условий контроля стерильности готового препарата (лабораторный и опытно-промышленный регламент).

Обоснование выбора платформы «Живые прецизионно аттенуированные вакцины, а также векторные рекомбинантные вакцины»

Конструирование аттенуированных штаммов патогенных микроорганизмов, пригодных для использования в качестве живых вакцин, за четыре месяца не представляется возможным без предварительных фундаментальных/поисковых исследований патогенов.

Использование методов генной инженерии позволяет идентифицировать и делетировать гены, необходимые для патогенности микроорганизмов, позволяя аттенуировать исходные штаммы, не способные далее к реверсии к вирулентной форме.

Для доставки гетерологичных антигенов описано использование различных серотипов *S. enterica* (серовары Typhi и Typhimurium), *Listeria monocytogenes*, штаммов *Lactobacillus*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus gordonii*, холерного вибриона, *Mycobacterium bovis* (BCG), *Y. enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* и *Mycobacterium smegmatis*.

Алгоритм разработки кандидатной вакцины в рамках технологического тренда «живые вакцины на основе аттенуированных прототипов патогенов» состоит на предварительном этапе из:

- создания коллекции эпидемически значимых штаммов и их всестороннего исследования с полногеномным секвенированием;
- подбора питательных сред и условий культивирования эпидемически значимых штаммов;
- создания аттенуированных векторных бактериальных штаммов с использованием современных генно-инженерных подходов, включая методы аллельного обмена и геномного редактирования;
- проверки биологических свойств полученных штаммов с использованием широкого спектра лабораторных моделей.

При непосредственной разработке прототипа вакцины на основе клинического материала необходимы:

- экспресс-тестирование клинического материала и одновременное проведение микробиологических исследований с выделением чистой культуры возбудителя;
- серологические исследования, выбор экспериментальной модели животных, полногеномное секвенирование выделенных штаммов-возбудителей заболевания с биоинформационным анализом секвенированных геномов;
- выбор потенциальных протективных антигенов, перспективных для использования в составе бактериальных живых платформ с использованием методологии обратной вакцинологии;
- конструирование штаммов – продуцентов потенциально протективных антигенов эпидемически значимых штаммов;
- поиск и адаптация эффективных векторных плазмид и штаммов-реципиентов;
- аналитическая и препаративная наработка рекомбинантных белков в клетках штаммов продуцентов;
- иммуно-биохимические исследования рекомбинантных белков;
- получение поли- и моноклональных антител;
- исследование взаимодействия антител с целевыми бактериальными штаммами;
- конструирование бактериальных живых рекомбинантных вакцин на основе бактериальных векторных штаммов;
- оптимизация экспрессии гетерологичных генов, кодирующих протективные антигены в клетках бактериальных векторных штаммов;
- изучение иммунобиохимических и протективных свойств созданных рекомбинантных штаммов, определение их вирулентности, реактогенности, адьювантных свойств и протективности на экспериментальных моделях животных в зависимости от способов заражения;
- оптимизация технологии культивирования, концентрирования и сушки препаратов живых рекомбинантных вакцин на основе бактериальных живых платформ.

Обоснование выбора платформы «Субъединичные полисахаридные вакцины»

Липополисахариды (ЛПС) являются основными протективными антигенами грамотрицательных бактерий, но использование их в качестве компонентов вакцин ограничено в силу высокой эндотоксичности. Химическая модификация или редактирование генома позволяют получать апиrogenные низкоэндотоксичные липополисахариды (детоксицированные ЛПС) из грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli* (O157, O104), *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*), обладающие высокой протективностью и безопасные для парентерального введения человеку, что создает основу для формирования технологического тренда по разработке полисахаридных вакцин против инфекций, вызываемых грамотрицательными бактериями (в том числе: *Salmonella* spp., *Escherichia* spp., *Shigella* spp., *Bordetella* spp., *Haemophilus*

spp., *Neisseria* spp., *Campylobacter* spp., *Vibrio* spp., *Klebsiella* spp., *Chlamydia* spp., *Corynebacterium* spp.).

Алгоритм разработки кандидатной вакцины в рамках технологического тренда «субъединичные полисахаридные вакцины» состоит из:

- создания банка аттенуированных штаммов-продуцентов и детоксицированных (низкоэндогенных) липополисахаридов;
- отработки технологии получения детоксицированных (низкоэндогенных) липополисахаридов на аттенуированных продуцентах из различных таксономических групп (лабораторный и опытно-промышленный регламент);
- проведения доклинических и клинических испытаний (I–II фаза) готовых лиофилизированных препаратов детоксицированных (низкоэндогенных) ЛПС.

Этапы непосредственной разработки включают:

- полногеномное секвенирование нового возбудителя; определение его таксономической принадлежности;
- исследования по аппаратурному и биопроцессному обеспечению выращивания в жидкой питательной среде культур штаммов грамотрицательных бактерий (подобранные питательные среды, отработанные режимы культивирования, режимы инактивации бактериальной массы);
- разработку технологии выделения и очистки детоксицированных (низкоэндогенных) препаратов ЛПС из штаммов грамотрицательных бактерий (выделение из бакмассы нативных ЛПС по методу Westphal, обработка нативных препаратов ДНКазой и РНКазой, ультрацентрифугирование, анализ химической структуры, лиофилизация препаратов, мягкий щелочной гидролиз нативных ЛПС);
- подтверждение эффективности процессов очистки с помощью химических методов контроля препарата, верификации мЛПС по структуре;
- изучение безвредности, иммуногенности и протективности низкоэндогенных препаратов ЛПС;
- проверку безвредности на кроликах и мышах, иммунизацию мышей, изучение сероконверсии в реакции иммуноферментного анализа (ИФА), изучение протективности на мышинных моделях – септической и колонизационной.

Обоснование выбора платформа «Субъединичные белковые вакцины»

Субъединичные вакцины конструируют на основе рекомбинатных и/или химически очищенных высокоиммуногенных протективных антигенов. В субъединичных вакцинах используются только специфические фрагменты (субъединицы) бактерий, которые иммунная система должна распознать. Они не содержат цельных микроорганизмов, за счет чего в них не содержатся балластные непротективные антигены, риск возникновения побочных эффектов при использовании незначителен. Типичными представителями этой группы иммунопрофилактических препаратов являются токсоидные вакцины. Поиск новых протективных антигенов в настоящее время проводят с помощью обратной вакцинологии, основная идея которой заключается в скрининге генома патогена с использованием биоинформатических подходов для поиска генов, кодирующих потенциально протективные антигены. Недостатком этого типа вакцин является то, что специфические антигены, используемые в субъединичной вакцине, могут не включать патоген-ассоциированных паттернов, распознаваемых иммунной системой хозяина. Кроме того, иммунный ответ на субъединичные вакцины может быть опосредован только антителами, без участия клеточного иммунитета, и, как следствие, быть слабее, чем у вакцин других типов. Для усиления иммунного ответа в состав субъединичных вакцин вводят адьюванты и/или проводят бустерные иммунизации.

Микрокапсулированные вакцины созданы на основе инкапсуляции антигенов, антигенных эпитопов и корпускулярных носителей антигенов – вирусных частиц, бактериальных клеток – в частицы, способные защитить их от деградации в тканях организма реципиента, доставить к иммунокомпетентным клеткам и создать депо антигена в организме. Для получения таких вакцин используются биodeградируемые носители (микрокапсулы, микро- и наносферы, микро- и наночастицы) с различной заданной скоростью распада под действием ферментативных систем органов и тканей. В зависимости от назначения микро(нано)капсулированного вакцинного препарата и вида антигенов размер носителя может варьировать от десятков нанометров до десятков и сотен микрометров. Известны и активно используются носители из гидрофобных (полилактид, полилактид-когликолид, липиды и др.) и гидрофильных (полисахариды, белки, кремнеземы и др.) материалов. Их общим свойством является

нетоксичность для макроорганизма как самих этих веществ, так и продуктов их распада. Например, полилактид-когликолид распадается в организме на молочную и гликолевую кислоты, участвующие в нормальном метаболизме, а липиды из оболочек липосом способны включаться в мембраны клеток макроорганизма.

Важным свойством микрокапсулированных вакцинных препаратов является их адаптация под конкретный способ введения, который может быть любым (парентерально, орально, интраназально и пр.). Также препарат может быть нацелен на конкретный орган (кишечник, селезенка, лимфоузлы и т.п.).

В экспериментальных условиях испытано несколько десятков таких вакцин. С помощью микросфер можно проводить комплексную вакцинацию против нескольких инфекций одновременно: каждая капсула может содержать несколько антигенов, а для иммунизации можно брать смесь различных микрокапсул. Таким образом, микрокапсулирование позволяет значительно сократить количество инъекций при вакцинации. Кроме того, сами микрокапсулы обладают выраженным адъювантным действием по причине как их корпускулярной природы, имитирующей естественные патогены, так и специфического химического строения. Это позволяет уменьшить дозы вводимых антигенов.

При реализации алгоритма разработки кандидатной вакцины в рамках технологической платформы «Субъединичные белковые вакцины», предварительные этапы разработок связаны с:

- созданием коллекции штаммов-продуцентов и плазмид для клонирования и экспрессии генов рекомбинантных белков;
- отработкой технологии клонирования экспрессии, выделения и очистки рекомбинантных белков;
- выбором технологии микро(нано-)капсулирования для создания конкретного вакцинного препарата.

Этапы непосредственной разработки:

- полногеномное секвенирование нового возбудителя, поиск открытых рамок считывания, аннотация генома, определение таксономической принадлежности нового возбудителя;
- определение методами обратной вакцинологии предположительных протективных антигенов, факторов патогенности и аллергенов данного возбудителя;
- выбор перспективных кандидатов для клонирования;
- расчет и синтез праймеров для клонирования генов выбранных белков;
- клонирование генов выбранных белков в экспрессирующих векторах;
- наработка рекомбинантных белков;
- иммунизация мышей рекомбинантными белками;
- получение иммунных сывороток;
- оценка иммуногенности белков методами ИФА, Вестерн-блота, проточной цитофлуориметрии;
- исследования *in vitro* и *in vivo*;
- идентификация антигенов;
- наработка препаративных количеств антигенов;
- подбор адъювантов, криопротекторов, стабилизаторов.

В заключение следует отметить, что несмотря на бурное развитие молекулярно-биологических методов, генно-инженерных подходов, методов иммунохимического анализа, создание эффективных вакцин против бактериальных патогенов является сложной задачей, решение которой для каждой нозологической формы инфекционного заболевания связано с глубокими фундаментальными исследованиями процессов иммунопатогенеза при взаимодействии «патоген–хозяин» и оптимальным выбором технологической платформы для разработки средств специфической профилактики или сочетания различных платформ.

Директор ФБУН «Государственный научный центр
прикладной микробиологии и биотехнологии»
Роспотребнадзора, академик РАН
И.А.Дятлов

Генетическое разнообразие и патогенный потенциал *Legionella pneumophila*, выделенных на отдельных территориях Российской Федерации

Э.А.Светоч, Н.К.Фурсова, Е.И.Асташкин, Б.В.Ерусланов, И.П.Мицевич, Н.Н.Карцев,
А.В.Попова, О.В.Коробова, И.А.Дятлов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,
Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Изучены фено- и генотипические свойства 39 изолятов *Legionella pneumophila*, выделенных из образцов воды систем горячего водоснабжения общественных зданий г. Сочи ($n = 33$) и шести других городов России ($n = 6$). Все 39 изолятов имели типичные культурально-морфологические и ферментативные свойства, образовывали биопленки, были чувствительными к антибиотикам и принадлежали к серогруппам 1 и 2–14. Изоляты серогруппы 1 были вирулентными для морских свинок. Выделенные в г. Сочи легионеллы принадлежали к 8 сиквенс-типам (ST) и 9 RAPD-генотипам. Идентифицированы как ранее описанные в России ST1 и ST87, так и новые для страны сиквенс-типы: ST366, ST1324, ST1326, ST1354, ST1376 и ST1434. Доминирующими сиквенс-типами были ST1, ST366 и ST87: они были выделены в 13 из 15 зданий (87% случаев); 5 минорных ST были выделены в 20% зданий. Большинство изолятов содержали в своих геномах пять генов вирулентности: *lvh*, *rtx*, *hsp60*, *dot* и *mip*, за исключением изолятов ST1326 и ST1354, которые несли 4 гена вирулентности – *rtx*, *hsp60*, *dot* и *mip*. Выделенные в других городах России *L. pneumophila* принадлежали к сиквенс-типам ST1, ST366, ST252 и к новому ST2813. Легионеллы наиболее распространенного в мире сиквенс-типа ST1 серогруппы 1 характеризовались наиболее выраженной способностью к биопленкообразованию.

Представленные в работе данные показывают, что мониторинг *L. pneumophila* в образцах воды систем горячего водоснабжения, изучение принадлежности их к серогруппам и сиквенс-типам позволяют с большей вероятностью оценить патогенный потенциал выделенных легионелл и провести необходимые мероприятия по их элиминации из водных источников, предупредив тем самым возможное заражение человека.

Ключевые слова: *Legionella pneumophila*, сиквенс-типы, гены вирулентности, биопленки

Для цитирования: Светоч Э.А., Фурсова Н.К., Асташкин Е.И., Ерусланов Б.В., Мицевич И.П., Карцев Н.Н., Попова А.В., Коробова О.В., Дятлов И.А. Генетическое разнообразие и патогенный потенциал *Legionella pneumophila*, выделенных на отдельных территориях Российской Федерации. Бактериология. 2022; 7(4): 10–23. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-10-23

Genetic diversity and pathogenic potential of *Legionella pneumophila* isolated in certain territories of Russian Federation

E.A.Svetoch, N.K.Fursova, E.I.Astashkin, B.V.Yerusanov, I.P.Mitsevich, N.N.Kartsev,
A.V.Popova, O.V.Korobova, I.A.Dyatlov

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

In this work, we studied the phenotypic and genotypic properties of 39 *Legionella pneumophila* isolates isolated from water samples of hot water supply systems of public buildings in Sochi ($n = 33$) and six other cities of Russian Federation ($n = 6$). All 39 isolates had typical cultural-morphological and enzymatic properties, formed biofilms, were sensitive to antibiotics and belonged to serogroups 1 and 2–14. Isolates of the serogroup 1 were virulent in guinea pigs. *Legionella* isolated in Sochi

Для корреспонденции:

Фурсова Надежда Константиновна, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 360-079
E-mail: fursova@ obolensk.org

Статья поступила 26.10.2022 г., принята к печати 28.12.2022 г.

For correspondence:

Nadezhda K. Fursova, Leading Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 360-079
E-mail: fursova@ obolensk.org

The article was received 26.10.2022, accepted for publication 28.12.2022

belonged to 8 sequence types (STs) and 9 RAPD genotypes. Previously described in Russian Federation ST1 and ST87 and novel sequence types for the country – ST366, ST1324, ST1326, ST1354, ST1376, and ST1434 – were identified in the study. The dominant sequence types were ST1, ST366 and ST87; they were identified in 13 out of 15 buildings, i.e. in 87% of cases; 5 minor STs were allocated in 20% of the buildings. Major isolates contained five virulence genes in their genomes: *lvh*, *rtx*, *hsp60*, *dot*, and *mip*, with the exception of isolates ST1326 and ST1354, which carried 4 virulence genes – *rtx*, *hsp60*, *dot*, and *mip*. *L. pneumophila* isolated in other cities of the Russian Federation belonged to sequence types ST1, ST366, ST252, and to the new ST2813. *Legionella* of the most common ST1 sequence type in the world, serogroup 1, they were characterized by the greatest ability to biofilm formation.

The data presented in the work show that monitoring *L. pneumophila* in water samples of hot water supply systems, studying their belonging to serogroups and sequence types makes it possible to more likely assess the pathogenic potential of isolated *Legionella* and take the necessary measures to eliminate them from water sources, thereby preventing possible human infection.

Key words: *Legionella pneumophila*, sequence-type, virulence genes, biofilm

For citation: Svetoch E.A., Fursova N.K., Astashkin E.I., Yeruslanov B.V., Mitsevich I.P., Kartsev N.N., Popova A.V., Korobova O.V., Dyatlov I.A. Genetic diversity and pathogenic potential of *Legionella pneumophila* isolated in certain territories of Russian Federation. *Bacteriology*. 2022; 7(4): 10–23. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-10-23

Легионеллезная инфекция (болезнь легионеров), известная уже более 30 лет, регистрируется во многих странах мира, в том числе в Российской Федерации (РФ), и по-прежнему представляет серьезную угрозу для общественного здравоохранения [1]. Инфекция может протекать в виде как спорадических случаев, так и крупных эпидемических вспышек [2]. Крупная и пока единственная вспышка легионеллеза в РФ произошла в 2007 г. в г. Верхняя Пышма Свердловской области (Уральский федеральный округ (УФО)), во время которой заболело более 100 человек, 5 из них умерло [3].

Основной возбудитель легионеллеза – *Legionella pneumophila*, представитель рода *Legionella*, насчитывающего на сегодня 50 видов, подавляющее большинство из которых циркулирует в природной среде и непатогенны для человека [4]. Бактерии вида *L. pneumophila* являются причиной легионеллеза приблизительно в 9 %, в 10% случаев болезнь могут вызывать виды *L. micdadei*, *L. longbeachae*, *L. dunoffii*, *L. bozemanii* и др. [5]. Вид *L. pneumophila* включает в себя 15 серогрупп, среди которых доминирующая роль в этиологии легионеллеза принадлежит серогруппе 1. С этой серогруппой связывают до 80% случаев всех форм легионеллезной инфекции: внебольничной, внутрибольничной и легионеллеза путешественников [6]. Отличительной биологической особенностью серогруппы 1 является вирулентность для морских свинок – экспериментальной модели, на которой лучше всего воспроизводятся картина легионеллезной пневмонии и патогенез инфекции, во многом напоминающие аналогичные патологические процессы при легионеллезе человека [7]. *L. pneumophila* серогрупп 2–15 в основном вызывают внутрибольничную инфекцию, поражая преимущественно иммунокомпрометированных пациентов, нередко вызывая у них летальный исход [8]. Легионеллы серогрупп 2–15, в отличие от серогруппы 1, непатогенны для морских свинок [9].

Успех профилактики легионеллезной инфекции во многом зависит от проведения систематического мониторинга легионелл в естественных и искусственных, создаваемых человеком, водных системах, благоприятных для персистенции и размножения микроба, а также от оценки патогенного потенциала выделяемых из водной среды легионелл [10]. Особого внимания заслуживают искусственные водные системы, в которых, в отличие от большинства природных,

концентрация легионелл может достигать опасного для человека уровня [11]. Важную роль в поддержании высоких концентраций патогена в искусственных водных системах играет способность легионелл образовывать биопленки, в составе которых микроб проявляет большую устойчивость к повреждающим факторам, в том числе к температуре, дезинфектантам и антибиотикам [12]. Образование аэрозолей из водных источников с эпидемически значимой концентрацией возбудителя и их аспирация являются основной причиной легионеллезной инфекции у человека.

Для оценки потенциальной опасности для человека изолятов *L. pneumophila*, выделяемых из водных систем, у них изучают фенотипические свойства, включая принадлежность к серогруппе, чувствительность к антибиотикам, способность к образованию биопленок, вирулентность для лабораторных животных. Кроме того, в их геномах исследуют наличие детерминант вирулентности, важных для возбудителя болезни легионеров, и определяют сиквенс-тип (ST) [European Guidelines, 2012]. К наиболее известным генам вирулентности, используемым исследователями для оценки патогенного потенциала легионелл, относят локусы *dot* и *lvh*, кодирующие компоненты системы секреции IV типа, важной для размножения патогена внутри клеток макроорганизма [13]; локус *rtx*, кодирующий белки, участвующие в процессах адгезии, цитотоксичности и формировании пор [14]; ген *hsp60*, который контролирует синтез 60 кДа белка теплового шока (Hsp60), способствующего инвазии легионелл и стимулирующего экспрессию цитокинов макрофагами [15]. Кроме того, исследуют ген *mip*, кодирующий 24 кД белок внешней мембраны «macrophage infectivity potentiator», который имеется у всех видов рода *Legionella* и обеспечивает их выживание в клетке-хозяине [16]. В ряде работ, кроме перечисленных выше, исследуются и другие гены вирулентности легионелл [17, 18].

Определение сиквенс-типа у *L. pneumophila* на основании мультилокусного секвенирования генов «домашнего хозяйства» (MLST), контролирующего отдельные звенья метаболизма в клетках, позволяет исследователю выявлять не только генетическое разнообразие легионелл, выделяемых из клинического материала и объектов внешней среды, но и оценить их эпидемическую значимость для человека, используя для этого сведения о сиквенс-типах, представленных в базе данных по sbt-типированию (Sequence-Based

Typing). Сиквенс-типирование *L. pneumophila* в сочетании с определением их принадлежности к серологической группе в настоящее время считается диагностическим референс-стандартом при расследовании этиологической причины вспышек легионеллезной инфекции [19]. Дальнейшее накопление данных о сиквенс-типах, выделяемых из клинического материала, будет способствовать выявлению наиболее опасных для человека генетических линий возбудителя, циркулирующих в определенных географических регионах. Это также, возможно, позволит установить связь между сиквенс-типом возбудителя и тяжестью течения вызываемого им заболевания.

Цель исследования – молекулярно-генетическая и фенотипическая характеристика изолятов *L. pneumophila*, выделенных в 2014 г. из образцов воды систем горячего водоснабжения зданий общественного назначения г. Сочи и других городов РФ, оценка потенциальной опасности их для человека; обобщение литературных данных по разнообразию сиквенс-типов *L. pneumophila*, выделенных за все время наблюдений в РФ, с 2005 по 2019 г.

Материалы и методы

Изоляты *Legionella pneumophila*

Основная часть изолятов ($n = 33$) была выделена при нашем участии в январе–феврале 2014 г. в г. Сочи (Южный федеральный округ (ЮФО)) из образцов воды систем горячего водоснабжения 15 зданий общественного назначения. Остальные изоляты легионелл ($n = 6$) были выделены в 2016 г. в Ростове-на-Дону (ЮФО) ($n = 2$), Калининграде (Северо-Западный федеральный округ (СЗФО)) ($n = 1$), Санкт-Петербурге (СЗФО) ($n = 1$), Мурманске (СЗФО) ($n = 1$) и Хабаровске (Дальневосточный федеральный округ (ДВФО)) ($n = 1$). Все изоляты хранятся в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур ФБУН ГНЦ ПМБ (ГКПМ-Оболенск) в лиофильно высушенном состоянии (табл. 1).

Видовая идентификация *L. pneumophila* была подтверждена в реакции латекс-агглютинации со специфичными диагностикумами (Oxoid, Англия), ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск, РФ), на масс-спектрометре MALDI-TOF (Bruker, Германия) и в полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени со специфичными праймерами («Амплиценс», Москва, РФ). Выращивали культуры на легионелбакагаре (ЛБА) с ростовыми добавками (ГНЦ ПМБ, Оболенск, РФ) в атмосфере 2,5% CO₂ при температуре 37°C в течение 24–48 ч.

Определение ферментативной активности

Каталазную и оксидазную активность, способность расщеплять гиппурат натрия, желатину, сбраживать углеводы, вызывать аутофлюоресценцию и образовывать коричневый пигмент на среде, содержащий тирозин, продуцировать β-лактамазу изучали у изолятов *L. pneumophila* методами, опубликованными в работах [20, 21].

Определение биопленкообразования

Способность изолятов *L. pneumophila* формировать монобиопленки в условиях *in vitro* определяли по методу, описан-

Таблица 1. Изоляты *L. pneumophila* и источники их выделения

ST	Источник	Температура, °C	Дата	Город, здание
366*	кран	60	20.01.2014	Сочи, №1, отель
1	кран	41	21.01.2014	Сочи, №2, отель
1	душевой рожок	43	23.01.2014	Сочи, №3, аэропорт
1	душевой рожок	55	23.01.2014	Сочи, №4, санаторий
366*	кран 1	60	24.01.2014	Сочи, №5, санаторий
366*	кран 2	50	24.01.2014	Сочи, №5, санаторий
366*	кран 3	45	24.01.2014	Сочи, №5, санаторий
366*	кран 4	50	24.01.2014	Сочи, №5, санаторий
366*	кран 5	45	24.01.2014	Сочи, №5, санаторий
1324	кран 1	55	25.01.2014	Сочи, №6, отель
1434	кран 2	55	25.01.2014	Сочи, №6, отель
1324	душевой рожок	56	25.01.2014	Сочи, №6, отель
1326	кран 4	52	27.01.2014	Сочи, №7, отель
1326	душевой рожок	53	27.01.2014	Сочи, №7, отель
1326	кран 1	52	27.01.2014	Сочи, №7, отель
1326	кран 2	52	27.01.2014	Сочи, №7, отель
1326	кран 3	50	27.01.2014	Сочи, №7, отель
1326	душевой рожок	50	27.01.2014	Сочи, №7, отель
1	кран 1	62	30.01.2014	Сочи, №8, отель
1	кран 2	60	30.01.2014	Сочи, №8, отель
366*	кран	57	28.01.2014	Сочи, №9, санаторий
87	душевой рожок	52	28.01.2014	Сочи, №9, санаторий
87	кран 1	28	29.01.2014	Сочи, №11, отель
87	кран 2	53	13.02.2014г.	Сочи, №11, отель
1354	кран 5	53	31.01.2014	Сочи, №12, база отдыха
1354	кран 3	53	31.01.2014	Сочи, №12, база отдыха
1354	душевой рожок	53	31.01.2014	Сочи, №12, база отдыха
366*	кран 4	53	31.01.2014	Сочи, №12, база отдыха
1354	кран 1	52	31.01.2014	Сочи, №12, база отдыха
87	кран 2	55	10.02.2014	Сочи, №12, база отдыха
366*	кран	52	31.01.2014	Сочи, №13, база отдыха
1	кран 3	33	03.012.2014	Сочи, №14, дворец спорта
1376	кран 3	50	03.02.2014	Сочи, №15
New	кран	н/д	н/д	Мурманск
2813	кран	н/д	н/д	Ростов-на-Дону
366*	кран	н/д	н/д	Хабаровск
252	кран	н/д	н/д	Калининград
1	душевой рожок	н/д	н/д	Санкт-Петербург
3М	2-14	1	н/д	Ростов-на-Дону
ATCC 33152	1	36	2013	LGS STANDARTS, England

ному Карповой Т.И. с соавт. [22]. Культуру *L. pneumophila* выращивали на среде ЛБА с цистеином в течение 48 ч при температуре 37°C, готовили микробную суспензию с концентрацией примерно 109 м.к. (по Мак-Фарланду) в стерильном физиологическом растворе. По 0,1 мл приготовленной суспензии вносили в 0,1 мл протеозопептонного бульона, разлитого в лунки планшета для иммунологических исследований (по 4 лунки каждого штамма). Планшеты с содержимым инкубировали в течение 96 ч при температуре 28°C. Затем содержимое лунок осторожно удаляли, лунки дважды промывали дистиллированной водой и добавляли в них 150 мкл дистиллированной воды и 15 мкл 1%-го спиртового раствора кристаллвиолета. Планшеты с содержимым инкубировали при температуре 20°C в течение 45 мин. Далее краситель удаляли, лунки дважды промывали дистиллированной водой. В отмытые от несвязавшейся краски лунки вносили по 0,2 мл этилового спирта и выдерживали в течение 45 мин при комнатной температуре. Интенсивность окрашивания спирта в лунках оценивали на фотометре Multiskan EX (Thermo, Голландия) при длине волны 540 нм. Эксперимент повторяли трижды. Средние арифметические значения оптической плотности окрашенного спирта обрабатывали по программе ANOVA в MS Excel.

Степень биопленкообразования оценивали относительно контрольных лунок планшета без культуры микроорганизма по критериям Rodrigues et al., 2010 [23]: отсутствие биопленки при $OD_t \leq OD_k$; слабое биопленкообразование при $OD_k < OD_t \leq 2 \times OD_k$; средняя степень биопленкообразования при $2 \times OD_k < OD_t \leq 4 \times OD_k$; сильно выраженное биопленкообразование при $4 \times OD_k < OD_t$, где OD_t – оптическая плотность тестируемого образца, OD_k – оптическая плотность контрольного образца.

Определение чувствительности к антимикробным препаратам

Чувствительность легионелл к антимикробным препаратам шести функциональных групп – макролидам, фторхинолонам, рифампинам, тетрациклинам, карбапенемам, фениколам – определяли диско-диффузионным методом. Полученные результаты интерпретировали в соответствии с рекомендациями EUCAST V.12.0, 2022. (<http://www.eucast.org>).

Определение вирулентности

Вирулентность изолятов *L. pneumophila* оценивали на морских свинках живой массой 250–300 г, полученных из питомника лабораторных животных «Андреевка» Научного центра биомедицинских технологий Российской академии наук (пос. Андреевка, Солнечногорский р-н, Московская обл., РФ). Животных заражали внутрибрюшинно 1 мл суспензии, содержащей $1,5 \times 10^7$ КОЕ/мл клеток легионелл. Каждым изолятом заражали двух животных. На протяжении всего срока наблюдения (10 дней) у морских свинок измеряли температуру, отмечали общее состояние, поведение, аппетит, проявление клинических симптомов болезни. В случае гибели инфицированного животного его вскрывали, из селезенки и легких готовили мазки-отпечатки, окрашивали их по Граму и микроскопировали. Одновременно по 0,2 мл 10%-й взвеси селезенки погибшего животного высевали на ЛБА и посевы

выращивали при температуре 37°C в течение 24–48 ч. Выросшие культуры идентифицировали на принадлежность к *L. pneumophila* в реакции латекс-агглютинации. Если животные в течение 10 дней после заражения оставались живыми, их умерщвляли в атмосфере CO₂, вскрывали и исследовали паренхиматозные органы на наличие легионелл так же, как от павших животных. Все эксперименты с морскими свинками проводили в соответствии с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных [24].

Серологическое типирование

Принадлежность изолятов *L. pneumophila* к серологической группе определяли в реакции латекс-агглютинации со специфическими диагностикумами производства фирмы Oxoid (Англия) и ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболensk, РФ).

Молекулярно-генетическое типирование

Для молекулярно-генетического анализа изолятов *L. pneumophila* использовали два метода: RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) с помощью случайных праймеров OPA11 и Wil2 в условиях, описанных Zimmer [25], и sbt-типирование (Sequence-Based Typing), в соответствии с протоколом Европейской сети надзора за легионеллезом (European Legionnaires Disease Surveillance Network/ELDSNet), основанном на амплификации 7 генов «домашнего хозяйства» (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *tompS*, *proA* и *neuA*) с помощью специфичных праймеров и программы амплификации, описанных ранее Quero et al. [26].

Филогенетический анализ

Дендрограмма, отражающая генетические взаимосвязи изученных изолятов *L. pneumophila*, была сконструирована на основании сравнения последовательностей ДНК генов, используемых для sbt-типирования, с помощью программного обеспечения Mega 6 (<https://www.megasoftware.net/>). Филогенетическая реконструкция была представлена с помощью метода «neighbor-joining», основанного на двухпараметровой модели нуклеотидных замен, ветви были генерированы бутстрапированием 1000 репликаций [27].

ПЦР-детекция генов вирулентности

У изолятов *L. pneumophila* детектировали гены вирулентности *dot*, *lvh* и *rtx*, *hsp60* и *mip* с помощью специфичных праймеров, ранее описанных в работах [13–15, 28].

Секвенирование ДНК и биоинформатический анализ

Секвенирование последовательностей ДНК осуществляли с помощью набора реактивов ABI PRISM®BigDye™ Terminator v.3.1 kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, США). Очищенные продукты анализировали на автоматическом ДНК-секвенаторе ABI PRISM 3100-Avant (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, США) в ООО SYNTOL (Москва, РФ). Идентификацию аллелей 7 генов «домашнего хозяйства» для SBT-типирования выполняли с помощью веб-ресурса Sequence-Based Typing protocol for typing of Legionella pneumophila VERSION 5.0 (<http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/Legionella-sbt>). Компьютерный анализ последовательностей ДНК проводили с помощью программы Vector NTI 9 (Invitrogen, США).

Таблица 2. Генотипические свойства изолятов *L. pneumophila*

Изолят	Серогруппа	Аллельный профиль SBT							ST	RAPD	Гены вирулентности	Номер в базе данных SBT
		<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>				
ATCC 33152	1	3	4	1	1	14	9	1	36	B	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	
007	1	1	4	3	1	1	1	1	1	A	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V9861
0030	1	1	4	3	1	1	1	1	1	A	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V9862
0034	1	1	4	3	1	1	1	1	1	A	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V9863
0225, 0228, 0303	1	1	1	4	3	1	1	1	1	A	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	
004, 0042, 0263, 0264, 0155, 0169	2–14	2	10	3	3	9	4	6	366	C ₁	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	
0156	2–14	2	10	3	3	9	4	6	366	C ₁	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V9866
0073	2–14	5	1	22	30	6	10	203	1324	D	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V10085
0075	2–14	5	1	22	30	6	10	203	1324	D	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	
0074	2–14	12	15	11	18	11	12	201	1434	E	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V10086
0146	2–14	3	10	1	28	14	9	207	1326	F	<i>rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V10086
0147, 0148, 0149, 0245, 0248	2–14	3	10	1	28	14	9	207	1326	F	<i>rtx hsp60 dot mip</i>	
0177	2–14	2	10	3	28	9	4	13	87	G	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V9968
0209, 0444, 0403	2–14	2	10	3	28	9	4	13	87	G	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	
0249	2–14	2	10	24	28	4	4	207	1354	C ₂	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V10088
0250, 0251, 0253	2–14	2	10	24	28	4	4	207	1354	C ₂	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	
0252, 0262	2–14	2	10	3	3	9	4	6	366	C ₃	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	
0308	2–14	1	4	3	16	2	1	208	1376	H	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V10089
1P	2–14	2	10	15	47	9	3	-	New	G ₁	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	
2P	1	17	10	15	3	2	3	11	2813	G ₂	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V13044
4K	1	2	10	3	3	9	4	6	366	G ₃	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V13041
5X	1	22	4	3	1	1	30	1	252	H ₃	<i>rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V13042
6C	1	1	4	4	1	1	1	1	1	H ₂	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V13043
3M	2–14	1	4	3	1	1	1	1	1	H ₁	<i>lvh rtx hsp60 dot mip</i>	EUL V13040

SBT – Sequence-Based Typing; ST – сиквенс-тип; RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA; New – новый сиквенс-тип, не идентифицирован.

Размещение в базе данных

В базе данных SBT-*Legionella pneumophila* размещены сиквенс-типы 16 штаммов, которым присвоены регистрационные номера: EULV9861, EULV9862, EULV9863, EULV10085, EULV10086, EULV10087, EULV9966, EULV9968, EULV10088, EULV9967, EULV10089, EULV13040, EULV13041, EULV13042, EULV13043, EULV13044 (табл. 2).

Результаты исследования

Культурально-морфологические и ферментативные свойства

Изученные изоляты *L. pneumophila* (табл. 1) на среде ЛБА с ростовыми добавками через 2 суток культивирования образовывали матовые некруглой формы колонии («ground glass») величиной 1,5–2 мм в диаметре. В мазках, окрашенных по Граму, наблюдали тонкие, длиной 2–3 мкм, грамотрицательные палочки. Изоляты обладали каталазной активностью, были оксидазоотрицательны, ферментировали крахмал, гидролизировали гиппурат натрия. Они обладали желатиназной и β-лактамазной активностями, образовывали пигмент на среде с тирозином, восстанавливали нитриты, не сбрасывали углеводов и не вызывали аутофлюоресценции. Таким образом, изоляты, независимо от источника и географического места их выделения, имели

типичные для *L. pneumophila* культуральные, морфологические и ферментативные признаки. Каких-либо атипичных свойств у данной группы легионелл обнаружено не было.

Образование биопленок

15 изолятов после 96 ч культивирования при температуре 28°C в протеозопептонном бульоне образовывали биопленки с разной степенью интенсивности (рис. 1).

В наибольшей степени эта способность была выражена у двух изолятов *L. pneumophila* сиквенс-типа ST1, принадлежащих к серогруппе 1: для изолята 0225 (№13), выделенного из воды систем горячего водоснабжения г. Сочи, и у изолята 6C (№2) из г. Санкт-Петербурга. В то же время у изолята 3M (№6) этого же сиквенс-типа (ST1), но принадлежащего к серогруппе 2–14, из г. Ростова-на-Дону, уровень биопленкообразования был почти в 2 раза ниже, чем у изолятов 0225 (№13) и 6C (№2). Сравнительно высокая способность к биопленкообразованию была отмечена для изолята 0042 (№8) сиквенс-типа ST366, выделенного в г. Сочи, и изолята 2P (№5) впервые описанного нами сиквенс-типа ST2813, ассоциированного с серогруппой 2–14. Среднюю способность к биопленкообразованию проявлял изолят 0177 (№12) сиквенс-типа ST87, принадлежащий к серогруппе 2–14.

Таблица 3. Сравнение характеристик сиквенс-типов *L. pneumophila*, выделенных в г. Сочи и других городах РФ

ST	RAPD-тип (количество изолятов)	Серогруппа	Гены вирулентности					Наличие вирулентности	OD ₅₄₀	Степень биоленкообразования	Город (здания)
			<i>lvh</i>	<i>rtx</i>	<i>hsp60</i>	<i>dot</i>	<i>mip</i>				
ST1	A (n = 6)	1	+	+	+	+	+	+	1,80 ± 0,18	высокая	Сочи (2–4, 8, 14)
ST366	C ₁ (n = 6) C ₃ (n = 2)	2–14	+	+	+	+	+	-	0,76 ± 0,06	высокая	Сочи (1, 3–5, 9, 12)
ST87	G (n = 4)	2–14	+	+	+	+	+	-	0,48 ± 0,03	средняя	Сочи (10–12)
ST1326	F (n = 6)	2–14	-	+	+	+	+	-	0,61 ± 0,05	высокая	Сочи (7)
ST1354	C ₂ (n = 4)	2–14	-	+	+	+	+	-	0,63 ± 0,05	высокая	Сочи (12)
ST1324	D (n = 2)	2–14	+	+	+	+	+	-	0,65 ± 0,05	высокая	Сочи (6)
ST1434	E (n = 1)	2–14	+	+	+	+	+	-	0,61 ± 0,04	высокая	Сочи (6)
ST1376	H (n = 1)	2–14	+					-	0,55 ± 0,03	средняя	Сочи (15)
ST?	G1 (n = 1)	2–14	+	+	+	+	-	-	0,52±0,04	средняя	Мурманск
ST2813	G ₂ (n = 1)	1	+	+	+	+	+	+	0,60 ± 0,04	высокая	Ростов-на-Дону
ST1	H ₁ (n = 1)	2–14	+	+	+	+	-	-	0,57 ± 0,04	высокая	Ростов-на-Дону
ST366	G ₃ (n = 1)	1	+	+	+	+	+	+	0,54 ± 0,04	высокая	Хабаровск
ST252	H ₃ (n = 1)	1	-	-	+	+	+	+	0,59 ± 0,04	высокая	Калининград
ST1	H ₂ (n = 1)	1	+	+	+	+	+	+	0,98 ± 0,07	высокая	Санкт-Петербург

ST – сиквенс-тип; RAPD – RAPD-тип; OD₅₄₀ – показатель степени биоленкообразования: единицы оптической плотности окрашенного кристаллвиолетом этилового спирта при длине волны 540 нм; «+» – наличие; «-» – отсутствие; ST? – сиквенс-тип не определен.

Чувствительность к антимикробным препаратам

Все 39 изолятов *L. pneumophila* были чувствительны к эритромицину, кларитромицину, азитромицину, ципрофлоксацину, рифампицину и хлорамфениколу – антибиотикам, которые используют в терапии легионеллеза. Они также были чувствительны к тетрациклину и меропенему.

Серотипирование изолятов *L. pneumophila*

На основании результатов латекс-агглютинации со специфичными диагностикумами выделенные изоляты *L. pneumophila* были отнесены к двум серологическим группам: 1

(n = 10) и 2–14 (n = 29) (табл. 2). Изоляты серогруппы 1 были выделены из образцов воды горячего водоснабжения 5 из 15 общественных зданий г. Сочи: двух отелей (здания №№ 2, 8), санатория (здание №4), международного аэропорта (здание №3) и ледового дворца спорта (здание №14). Изоляты этой серогруппы были выделены также в гг. Калининграде, Санкт-Петербурге, Ростове-на-Дону и Хабаровске. Культуры *L. pneumophila* серогруппы 2–14 были изолированы в 11 зданиях г. Сочи: шести отелях (здания №№ 1, 6–8, 10, 11), двух базах отдыха (здания №№ 12, 13) и пассажирском судне (№15). В двух отелях (здания №№ 8, 11) одновременно были изолированы *L. pneumophila* серогруппы 2–14 и 1. Изоляты серогруппы 2–14 были выделены также в Ростове-на-Дону и Мурманске.

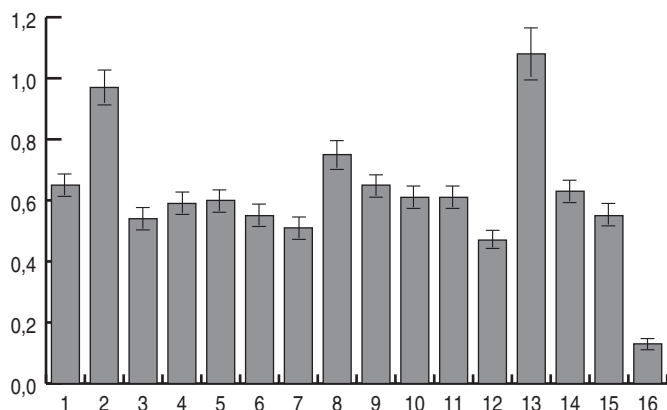


Рис. 1. Степень биоленкообразования у изолятов *L. pneumophila* разных сиквенс-типов в протеозопептонном бульоне после 96 ч инкубирования при температуре 28°C. OD₅₄₀ – единицы оптической плотности окрашенного кристаллвиолетом этилового спирта при длине волны 540 нм.

1 – ATCC33152 (ST36, сер. 1); 2 – 6C (ST1, сер. 1); 3 – 4K (ST366, сер. 1); 4 – 5X (ST252, сер. 1); 5 – 2P (ST2813, сер. 1); 6 – 3M (ST1, сер. 2–14); 7 – 1P (ST н/о, сер. 1); 8 – Д042 (ST366, сер. 2–14); 9 – 0073 (ST1324, сер. 2–14); 10 – 0074 (ST1434, сер. 2–14); 11 – 0146 (ST1326, сер. 2–14); 12 – 0177 (ST87, сер. 2–14); 13 – 0225 (ST1, сер. 1); 14 – 0249 (ST1354, сер. 2–14); 15 – 0308 (ST1376, сер. 2–14); 16 – контроль (питательная среда).

Вирулентность изолятов *L. pneumophila* для морских свинок

Как показали наши исследования, все десять изолятов *L. pneumophila* серотипа 1, выделенные из образцов воды общественных зданий г. Сочи и других городов РФ, оказались вирулентными для морских свинок: животные после заражения их дозой $1,5 \times 10^7$ КОЕ заболели и погибли. Первые клинические признаки болезни у животных проявлялись на 3–4-е сутки после инфицирования: повышенная температура (39,5–41,0°C), вялость, малоподвижность, отсутствие аппетита (не принимали корм); в последующие дни у животных наступало состояние протрации, поражались глаза, на 5–8-е сутки болезни они погибали. При вскрытии у павших морских свинок наблюдали перитонит со скудным фибринозным экссудатом, гиперемию париентальной брюшины с резкой инъекцией сосудов. Печень и селезенка были увеличены с фибринозным налетом на капсуле. В селезенке встречались мелкие очаги некроза. В мазках-отпечатках из селезенки, окрашенных по Граму, отмечали сотни тонких грамотрицательных палочек; от всех павших животных на

среде ЛБА с ростовыми и селективными добавками были выделены культуры, которые давали положительную латекс-агглютинацию со специфическими диагностикумами для определения *L. pneumophila* серотипа 1 и не реагировали с диагностикумом для определения серотипов 2–14.

У животных, зараженных изолятами *L. pneumophila* серогруппы 2–14, на протяжении всего срока наблюдения (10 суток) клинических симптомов болезни не отмечали. При вскрытии умерщвленных животных визуальных патологических изменений внутренних органов не было, в мазках-отпечатках из селезенок, окрашенных по Граму, бактериальные клетки отсутствовали. Выделить на ЛБА культуры легионелл из органов умерщвленных животных также не удалось. Следовательно, в эксперименте не было получено каких-либо свидетельств о вирулентности изолятов *L. pneumophila* серогруппы 2–14 для морских свинок, т.е. они были авирулентными для данного вида животных.

Генотипирование изолятов *L. pneumophila*, выделенных в г. Сочи

Результаты генотипирования изолятов *L. pneumophila*, представленные в табл. 2, 3, показывают, что выделенные из образцов воды систем горячего водоснабжения общественных зданий г. Сочи легионеллы ($n = 33$) принадлежат к 8 сиквенс-типам и 9 RAPD-генотипам. Среди легионелл идентифицированы как ранее описанные в РФ сиквенс-типы ST1 и ST87, так и новые для страны сиквенс-типы: ST366, ST1324, ST1326, ST1354, ST1376 и ST1434. Самыми распространенными сиквенс-типами *L. pneumophila*, выделенными в г. Сочи, являлись сиквенс-типы ST1 и ST366. Изоляты сиквенс-типа ST1 были выделены в 5 из 15 обследованных зданий: двух отелях, санатории, международном аэропорте и ледовом дворце спорта (здания №№ 2, 3, 4, 8 и 14, см. табл. 1, 3). Все изоляты ($n = 6$) этого сиквенс-типа имели одинаковый RAPD-генотип А и принадлежали к серогруппе 1 (табл. 2). Изоляты *L. pneumophila* сиквенс-типа ST366 ($n = 9$) также были выделены из образцов воды 5 из 15 обследованных зданий (табл. 1, 3). При этом 5 из 9 изолятов этого сиквенс-типа были выделены из образцов воды, взятых в разных точках (кранах) одного здания (№5), остальные четыре изолята – из образцов воды четырех зданий (№№ 1, 9, 12, 13) (табл. 1, 3). Все изоляты сиквенс-типа ST366 принадлежали к серогруппе 2–14, однако, в отличие от изолятов сиквенс-типа ST1, были отнесены к двум RAPD-генотипам: 7 изолятов – к генотипу С1, два других – к генотипу С3 (табл. 2, 3).

Следующими по частоте встречаемости в образцах воды общественных зданий были изоляты *L. pneumophila* сиквенс-типа ST87 ($n = 4$), выделенные в 3 из 15 зданий (№№ 10–12), изоляты имели одинаковый RAPD-генотип (G) и принадлежали к серогруппе 2–14 (табл. 2, 3).

Изоляты легионелл сиквенс-типов ST1326 ($n = 6$), ST1354 ($n = 4$), ST1324 ($n = 2$), ST1434 ($n = 1$) и ST1376 ($n = 1$) встречались редко: каждый из них был выделен только из образцов воды одного здания (табл. 1, 3). Все указанные минорные сиквенс-типы имели свои оригинальные RAPD-генотипы и принадлежали к серогруппе 2–14 (табл. 2, 3). Из этой группы сиквенс-типов обращает на себя внимание сиквенс-тип ST1326, который был определен у изолята, выделенного

из образцов воды, взятых в 6 разных точках системы горячего водоснабжения одного здания (№7) (табл. 1), что может говорить о высоком колонизационном потенциале этого сиквенс-типа.

Сиквенс-типы *L. pneumophila*, идентифицированные в других городах России

Изоляты *L. pneumophila* ($n = 6$) были выделены из образцов воды систем горячего водоснабжения пяти городов РФ: Калининграда, Санкт-Петербурга, Мурманска, Ростова-на-Дону и Хабаровска. Результаты SBT-генотипирования показали, что изолят 5X, выделенный в г. Калининграде (СЗФО), принадлежит к ранее не описанному в РФ сиквенс-типу ST252; изолят 6С, выделенный в г. Санкт-Петербурге (СЗФО), – к сиквенс-типу ST1. Оба сиквенс-типа, ST252 и ST1, были ассоциированы с серогруппой 1. У изолята 1P, выделенного в г. Мурманске (СЗФО), сиквенс-тип установить не удалось, поскольку у него не определился седьмой ген «домашнего хозяйства» – *neuA*. В г. Ростове-на-Дону (ЮФО) были изолированы две культуры легионелл: изолят 2P и изолят 3M. Изолят 2P был отнесен нами к новому сиквенс-типу, зарегистрированному в базе данных по SBT-типированию *L. pneumophila* под номером EULV13044 как сиквенс-тип ST2813; изолят этого нового сиквенс-типа принадлежал к серогруппе 1. Второй изолят, 3M, относился к сиквенс-типу ST1 и принадлежал к серогруппе 2–14. Изолят 4K, выделенный в г. Хабаровске (ДВФО), принадлежал к впервые описанному в РФ сиквенс-типу ST366, который, как отмечалось выше, был одним из доминирующих сиквенс-типов *L. pneumophila* в г. Сочи. Однако, в отличие от изолятов сиквенс-типа ST366 серогруппы 2–14, выделенных в г. Сочи, изолят 4K принадлежал к серогруппе 1. Все 6 изолятов, описанных выше, имели уникальные RAPD-генотипы (табл. 2, 3).

Детекция генов вирулентности *L. pneumophila*

Детерминанты вирулентности были определены у 39 изолятов *L. pneumophila*, включая 33 изолята, выделенных в г. Сочи, и 6 изолятов, выделенных в пяти других городах РФ. Представленные в табл. 2 данные свидетельствуют о том, что выделенные в г. Сочи изоляты шести сиквенс-типов, в том числе доминирующих ST1, ST366 и ST87 и минорных ST1324, ST1434 и ST1376, содержали все пять определяемых в работе детерминант вирулентности: *lvh*, *rtx*, *hsp60*, *dot* и *tip*. У изолятов минорных сиквенс-типов ST1326 и ST1354 было выявлено только четыре гена вирулентности – ген *lvh* у них отсутствовал. У выделенных в гг. Ростове-на-Дону, Хабаровске и Санкт-Петербурге изолятов 3M, 4K и 6С, имевших соответственно сиквенс-типы ST1, ST366 и ST1, также были идентифицированы все пять генов вирулентности. Детектируемые гены вирулентности были обнаружены и у изолята 2P (г. Ростов-на-Дону) нового сиквенс-типа ST2813, и у изолята 1P (г. Мурманск) неидентифицированного сиквенс-типа. У изолята 5X сиквенс-типа ST252 (г. Калининград) были детектированы лишь четыре гена вирулентности – ген *lvh*, так же как и у минорных сиквенс-типов ST1326 и ST1354 (г. Сочи), отсутствовал.

Таким образом, из 10 изученных нами сиквенс-типов *L. pneumophila* семь (ST1, ST366, ST87, ST1324, ST1434,

Таблица 4. Количество изолятов *L. pneumophila* детектированных в данной работе сиквенс-типов в других странах мира (база данных SBT *L. pneumophila* на 12.07.2019).

ST	Страны мира	Источники выделения	
		Клинический материал, шт.	Окружающая среда, шт.
ST1	Многие страны мира	915	713
ST87	13 стран: Германия, Испания, Бельгия, Латвия, Канада, Франция, Польша, Дания, Израиль, Греция, Япония, Чехия, Швеция	20	43
ST252	4 страны: США, Тайвань, Франция, Нидерланды	6	1
ST366	4 страны: Италия, Великобритания, Латвия, Канада,	3	5
ST1324	8 стран: Канада, Великобритания, Чехия, Германия, Китай, Франция, Швейцария, Латвия	15	12
ST1326	3 страны: Великобритания, Канада, Германия	4	5
ST1354	5 стран: Чехия, Латвия, Германия, Канада, Япония	2	22
ST1376	3 страны: Германия, Чехия, Швеция	3	9
ST1434	2 страны: Швейцария, Китай	1	2
ST2813 (новый)	Данные отсутствуют	0	0

ST – сиквенс-тип.

ST1376 и ST2813) были ассоциированы с пятью детектируемыми генами вирулентности (*lvh*, *rtx*, *hsp60*, *dot* и *mip*), а три сиквенс-типа (ST1326, ST1354 и ST252) – с четырьмя, так как у них отсутствовал важный для возбудителя легионеллеза ген *lvh*.

В табл. 3 отражены основные характеристики сиквенс-типов *L. pneumophila*, выделенных в г. Сочи и других городах РФ. Выявленные между ними различия по частоте распространения в системах горячего водоснабжения, по всей вероятности, отражают и разную их этиологическую значимость в качестве возбудителей легионеллезной инфекции. В табл. 4 представлены данные по частоте встречаемости детектированных нами сиквенс-типов *L. pneumophila* в других странах мира, с учетом источника их выделения (клинический материал или окружающая среда). Такие сведения важны для оценки патогенного потенциала каждого выявленного нами сиквенс-типа.

Из табл. 4 следует, что изоляты *L. pneumophila* доминирующих в г. Сочи сиквенс-типов ST1 и ST87 довольно часто выделялись во многих странах мира, как из клинического материала, так и из объектов окружающей среды. Особенно это касается сиквенс-типа ST1, ассоциированного с серогруппой 1. Два минорных (в г. Сочи) сиквенс-типа ST1324 и ST1354 выявлены в девяти и пяти странах соответственно, в то время как доминирующий в г. Сочи сиквенс-тип ST366 и минорные сиквенс-типы ST1326, ST1434 и ST1376 – лишь в нескольких странах и представлены в базе данных незначительным числом изолятов. Это же справедливо и в отношении изолята сиквенс-типа ST252, выделенного в г. Калининграде. Тем не менее важно отметить тот факт, что все детектированные в нашей работе сиквенс-типы *L. pneumophila*, включая минорные (за исключением нового сиквенс-типа, описанного впервые в данном исследовании), были выделены в других странах мира не только из объектов окружающей среды, но и из клинического материала.

Филогенетический анализ

Сравнительный анализ суммарного пула нуклеотидных последовательностей семи генов, используемых при SBT-

типировании *L. pneumophila*, показывает, что изученные нами изоляты формируют на дендрограмме две дискретные филогенетические группы (рис. 2).

В одну группу входят изоляты трех доминирующих, часто встречающихся в г. Сочи сиквенс-типов ST1, ST87 и ST366, а также изоляты сиквенс-типов ST1, ST366 и ST252 и нового сиквенс-типа ST2813, выделенных в гг. Ростове-на-Дону, Санкт-Петербурге, Калининграде и Хабаровске, а также контрольный штамм *L. pneumophila* ATCC33152 сиквенс-типа ST36. Вторую филогенетическую группу формируют минорные, редко выявлявшиеся в г. Сочи изоляты ($n = 14$) пяти сиквенс-типов: ST1324, ST1326, ST1354, ST1376 и ST1434. Данные филогенетического анализа свидетельствуют не только о генетическом разнообразии популяции *L. pneumophila*, циркулирующих в системах горячего водоснабжения г. Сочи, но и о существовании среди этой популяции легионелл отдельных генетически родственных групп (линий), роль которых в этиологии легионеллеза может быть различной.

Сиквенс-типы *L. pneumophila*, детектированные в РФ за все время наблюдений (2005–2019 гг.)

Генетический мониторинг (SBT-типирование) *L. pneumophila* начали проводить в РФ с 2005 г., когда в г. Верхняя Пышма Свердловской обл. произошла крупная вспышка легионеллезной инфекции [29]. Представленные ниже данные по сиквенс-типам *L. pneumophila*, выявленных в РФ за все время наблюдений, получены на основании анализа работ российских исследователей и базы данных по SBT-типированию *L. pneumophila*. Как следует из рис. 3, за все время наблюдений в различных географических и климатических зонах РФ были выявлены легионеллы 66 сиквенс-типов: ST1, ST7, ST9, ST17, ST36, ST42, ST51, ST59, ST80, ST87, ST110, ST114, ST145, ST146, ST147, ST191, ST246, ST252, ST292, ST308, ST310, ST319, ST320, ST321, ST322, ST323, ST324, ST325, ST326, ST327, ST329, ST338, ST366, ST377, ST423, ST498, ST500, ST514, ST515, ST516, ST517, ST518, ST519, ST520, ST521, ST522, ST536, ST554, ST586, ST587, ST588, ST589, ST590, ST677, ST683, ST684,

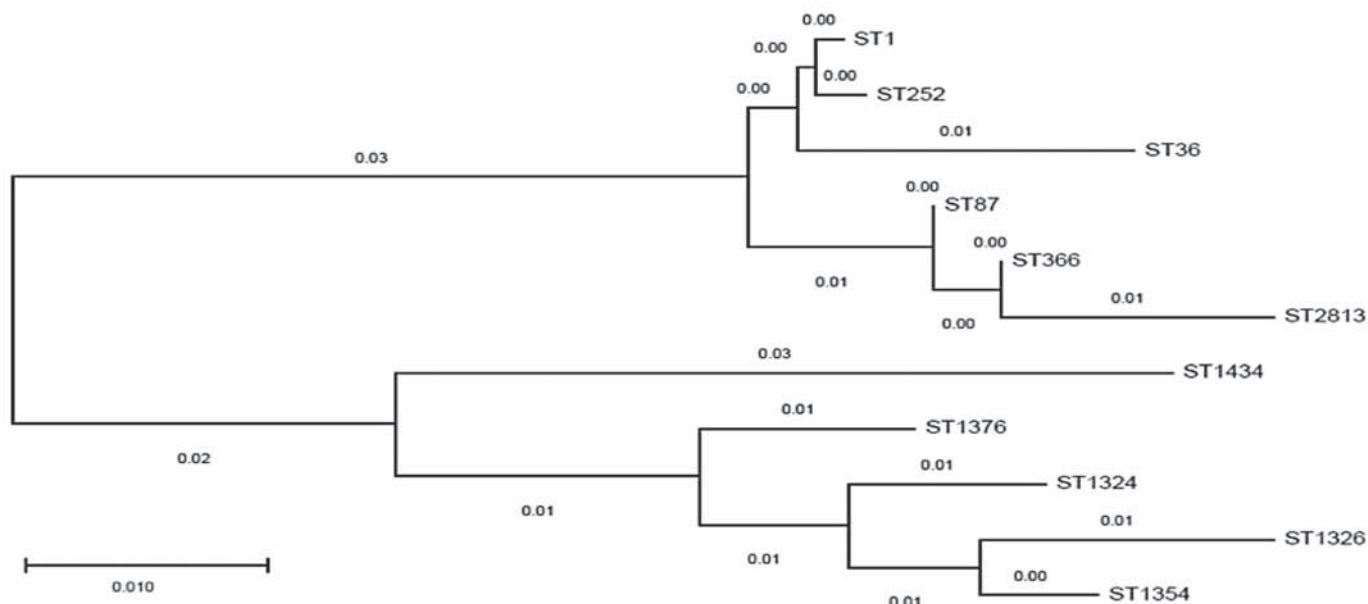


Рис. 2. Дендрограмма сиквенс-типов *L. pneumophila*.

ST727, ST728, ST729, ST1324, ST1326, ST1434, ST1354, ST1376, ST1489 и ST2813. Среди них только восемь сиквенс-типов были ассоциированы с клиническими изолятами: ST146 и ST308 изолятов, выделенных от больных при эпидемической вспышке легионеллеза в г. Верхняя Пышма; ST500 изолята, выделенного от пациента, больного легионеллезом путешественников, в г. Казани (Приволжский федеральный округ); ST36, ST42 и ST87 изолятов, выделенных от умерших людей при внутрибольничном легионеллезе в г. Москва [30]; ST1489 и ST110 клинических изолятов, происхождение которых не известно. Остальные 58 сиквенс-типов были ассоциированы с изолятами *L. pneumophila*, выделенными из различных объектов окружающей среды, в основном из образцов воды систем горячего водоснабжения общественных зданий, градирен промышленных предприятий и бассейнов.

Наибольшее число сиквенс-типов *L. pneumophila* ($n = 43$) было выявлено в УФО: в гг. Верхняя Пышма, Екатеринбург, Первоуральске и Артемовске. В ЦФО (г. Москва, Московская и Тверская области) было идентифицировано 15 сиквенс-типов *L. pneumophila*, в ЮФО (гг. Сочи и Ростов-на-Дону) – 9 сиквенс-типов, в том числе один новый, идентифицирован-

ный нами сиквенс-тип ST2813. В Ханты-Мансийском автономном округе (УФО) детектировано четыре сиквенс-типа, в республике Татарстан – два сиквенс-типа. По одному сиквенс-типу было выявлено в гг. Калининграде, Санкт-Петербурге и Хабаровске. Важно отметить, что из 66 сиквенс-типов, детектированных в РФ за все время наблюдений, 21 сиквенс-тип был ассоциирован с эпидемически важной серогруппой 1: ST1, ST7, ST9, ST36, ST42, ST59, ST110, ST145, ST159, ST246, ST252, ST308, ST320, ST324, ST366, ST498, ST500, ST515, ST521, ST729, ST1489 и ST2813 (рис. 3).

Анализ сиквенс-типов *L. pneumophila*, выявленных в трех разных регионах РФ (УФО, ЦФО и ЮФО), указывает на существенные различия в структуре циркулирующих в этих регионах сиквенс-типов. Так, из 43 сиквенс-типов, выявленных в УФО, только один ST87 встречался в двух других регионах: ЦФО и ЮФО. Из 17 сиквенс-типов, выявленных в ЦФО, только два (ST1 и ST87) были детектированы в ЮФО. Следует заметить, что оба эти сиквенс-типа относятся к группе сиквенс-типов *L. pneumophila*, наиболее часто встречающихся во многих странах мира. Дальнейшие исследования по изучению разнообразия сиквенс-типов *L. pneumophila*, циркулирующих в округах РФ, позволят приблизиться к ответу на вопрос, насколько географическое положение региона, его климатические условия могут влиять на генетическое разнообразие формирующихся в регионах популяций *L. pneumophila*.

Обсуждение

В январе-феврале 2014 г. в г. Сочи, столице XIV Зимних Олимпийских Игр, был проведен одномоментный мониторинг *L. pneumophila* в образцах воды систем горячего водоснабжения 50 общественных зданий города. В результате исследований из образцов воды 15 обследованных зданий (т.е. в 30% случаев) были выделены 33 изолята *L. pneumophila*. Кроме того, были изучены свойства еще шести культур *L. pneumophila*, выделенных в других регионах РФ. Все 39 изученных изолята имели типичные для *L. pneumophila* культуральные, морфоло-

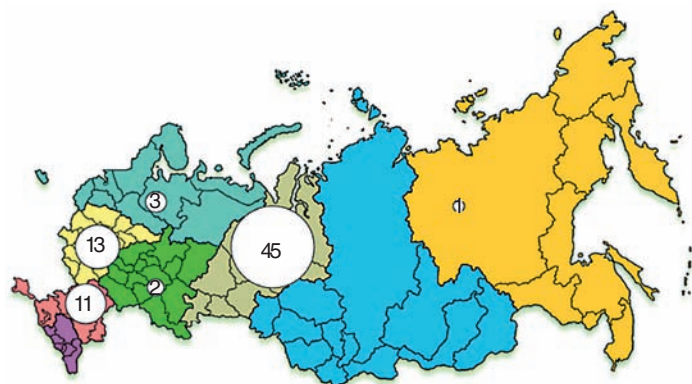


Рис. 3. Количество изолятов *L. pneumophila*, выделенных в федеральных округах РФ: Уральском ($n = 45$), Центральном ($n = 13$), Южном ($n = 11$), Северо-Западном ($n = 3$), Приволжском ($n = 2$) и Дальневосточном ($n = 1$).

гические и ферментативные свойства. Изоляты были чувствительны к эритромицину, кларитромицину, рифампицину и хлорамфиниолу – основным антибиотикам, применяемым для лечения легионеллеза. Следует заметить, что в РФ, как и в других странах, до настоящего времени не было сообщений о выделении легионелл, устойчивых к антибиотикам, хотя во всех странах уже длительное время широко используют антимикробные препараты. Отрицательные результаты по обнаружению антибиотикорезистентных *L. pneumophila*, тем не менее, не являются основанием для прекращения мониторинговых исследований их чувствительности к антимикробным препаратам, поскольку сегодня мы не можем исключить внезапного появления резистентных легионелл в опасных для человека водных объектах.

Особый интерес, на наш взгляд, представляют результаты, полученные при изучении сиквенс-типов изолятов *L. pneumophila*, циркулировавших в январе–феврале 2014 г. в системах горячего водоснабжения г. Сочи. Как оказалось, выделенные в этот период изоляты *L. pneumophila* были представлены сравнительно незначительным числом сиквенс-типов – всего восемью сиквенс-типами, которые различались между собой по частоте их выявления в исследуемых образцах воды (табл. 3). Три сиквенс-типа (ST1, ST366 и ST87) являлись доминирующими: они были выделены из образцов воды 12 из 15 «легионелла-позитивных» зданий (табл. 3), т.е. в 80% случаев. При этом изоляты сиквенс-типов ST1 и ST366 были выделены каждый в пяти различных зданиях, а изоляты сиквенс-типа ST87 – в трех зданиях. Изоляты пяти минорных сиквенс-типов (ST1324, ST1326, ST1354, ST1376 и ST1434) были выявлены в трех зданиях, т.е. в 20% случаев, причем каждый сиквенс-тип был идентифицирован только в пробах воды одного здания (табл. 1, 3). Разница в частоте обнаружения изолятов легионелл доминирующих и минорных сиквенс-типов косвенно говорит об их существенных биологических и генетических различиях. О генетических различиях этих двух групп сиквенс-типов свидетельствует также их филогенетический анализ: на дендрограмме (рис. 1) доминирующая и минорная группы формируют две дискретные ветви. Следовательно, в январе–феврале 2014 г. системы горячего водоснабжения 15 из 50 общественных зданий г. Сочи были «оккупированы» преимущественно тремя филогенетически близкими сиквенс-типами *L. pneumophila*: ST1, ST366 и ST87.

Изоляты *L. pneumophila* доминирующего сиквенс-типа ST1 ($n = 6$) были выделены в 5 из 15 «легионелла-позитивных» зданий г. Сочи, т.е. в 33% случаев. Несмотря на разные источники выделения, все 6 изолятов ST1 имели один RAPD-генотип D и относились к серогруппе 1; в их геномах присутствовали все пять детектируемых генов патогенности: *lvh*, *rtx*, *hsp60*, *dot* и *mip*, все изоляты вызывали гибель морских свинок (табл. 3). Для изолята этого сиквенс-типа была отмечена самая высокая интенсивность биопленкообразования, которая, вероятно, и обеспечивает колонизационную активность легионелл этого сиквенс-типа (рис. 1). *L. pneumophila* сиквенс-типа ST1, как это следует из базы данных по SBT-типированию, широко распространены во многих странах мира, как в клиническом материале при различных формах легионеллеза, так и в объектах внешней среды. Изоляты ST1 очень часто ассоциированы с серогруппой 1,

которая, как известно, является основной этиологической причиной групповых и спорадических случаев легионеллезной инфекции. Таким образом, циркулировавшие в системе горячего водоснабжения общественных зданий г. Сочи изоляты *L. pneumophila* сиквенс-типа ST1 серогруппы 1 представляли реальную опасность для людей.

Изоляты *L. pneumophila* сиквенс-типа ST366 ($n = 9$), как и изоляты ST1, были выделены в 5 зданиях: 5 изолятов из пяти разных точек забора воды одного здания, остальные четыре – по одному изоляту из каждого из четырех зданий (табл. 1, 3). Столь высокая колонизационная активность легионелл сиквенс-типа ST366 согласуется с их сравнительно высокой способностью в опытах *in vitro* образовывать биопленки (рис. 1). Изоляты сиквенс-типа ST366, в отличие от других детектированных в работе сиквенс-типов, оказались генетически неоднородными и подразделялись на два RAPD-генотипа: 7 изолятов имели генотип C1, два других – генотип C3 (табл. 2, 3). Деление изолятов на два RAPD-генотипа свидетельствует, что современная схема SBT-типирования *L. pneumophila* на основе семи генов «домашнего хозяйства» в отдельных случаях не может дискриминировать генетически близкие изоляты легионелл. Не исключено, что потребуются дальнейшее совершенствование этой системы путем расширения набора генов для SBT-типирования, как это произошло в 2007 г., когда в схему шестигенного SBT-типирования *L. pneumophila* был включен новый седьмой ген [31]. Все 9 изолятов ST366 принадлежат к серогруппе 2–14, что отличает их от изолятов этого сиквенс-типа, представленных в базе данных по SBT-типированию *L. pneumophila* [32, 33], которые ассоциированы исключительно с серогруппой 1. Изученные нами изоляты ST366 имели в своих геномах, как и изоляты ST1, те же 5 детектируемых генов вирулентности, тем не менее эти изоляты были непатогенными для морских свинок (табл. 3). Свойства изученных нами изолятов ST366 и сведения, представленные в базе данных, свидетельствуют о биологическом и генетическом разнообразии изолятов этого сиквенс-типа и, возможно, об их различной роли в патологии человека. Данные о распространении *L. pneumophila* ST366 весьма ограничены: на 12 июля 2019 г. они были выявлены в четырех странах: Италии, Великобритании, Латвии и Канаде (табл. 4) и представлены в базе всего 8 изолятами, три из которых клинические, а пять выделены из окружающей среды; все 8 изолятов принадлежали к серогруппе 1. Поскольку данные о выделении изолятов ST366 серогруппы 2–14 из клинического материала в базе данных отсутствуют, делать заключение о патогенном потенциале изученных нами изолятов сиквенс-типа ST366 серогруппы 2–14 пока преждевременно. Необходимы дальнейшие наблюдения за *L. pneumophila* ST366 серогруппы 2–14.

Изоляты *L. pneumophila* сиквенс-типа ST87 ($n = 4$), составляющие вместе с изолятами ST1 и ST366 доминирующую группу и имеющие с ними, как это видно из дендрограммы (рис. 2), филогенетическое родство, были выделены из образцов воды 3 из 15 «легионелла-позитивных» зданий г. Сочи (табл. 3), т.е. в 20% случаев. Все 4 изолята ST87 были отнесены к одному RAPD-генотипу G и к серогруппе 2–14, что говорит об одном источнике легионелл этого сиквенс-типа для трех зданий. Как и у изолятов ST1 и ST366, у них

были детектированы все 5 генов вирулентности, тем не менее они были непатогенными для морских свинок; изоляты этого сиквенс-типа были способны формировать *in vitro* биопленку, но интенсивность ее образования была низкой. В базе данных по SBT-типированию *L. pneumophila* сиквенс-типа ST87 на 12 июля 2019 г. были представлены 63 изолятами, выделенными в 10 странах Европейского союза, а также в РФ, Канаде, Японии и Израиле (табл. 4). Из 63 изолятов 20 были выделены из клинического материала при различных формах легионеллеза: внебольничном, нозокомиальном и легионеллезе путешественников. Российскими исследователями была установлена прямая связь между штаммами *L. pneumophila* ST87, выделенными из образцов воды системы горячего водоснабжения Гематологического центра г. Москвы (РФ), и групповой вспышкой ($n = 4$) легионеллеза среди больных отделения реанимации и интенсивной терапии, закончившейся для них летально [30]. Приведенные выше данные являются веским основанием для того, чтобы сделать заключение о серьезном патогенном потенциале изученных нами изолятов *L. pneumophila* сиквенс-типа ST87, выделенных из образцов воды систем горячего водоснабжения г. Сочи, для людей.

Изоляты *L. pneumophila* минорных сиквенс-типов ST1324, ST1326, ST1354, ST1376 и ST1434, каждый из которых был выделен из образцов воды только одного здания г. Сочи, имели свои, характерные только для них, RAPD-генотипы и принадлежали к серогруппе 2–14 (табл. 2, 3). Все они были способны образовывать в условиях *in vitro* биопленки (рис. 1). На дендрограмме легионеллы минорных сиквенс-типов формируют одну ветвь, что говорит об их филогенетическом родстве (рис. 2). В то же время изоляты минорных сиквенс-типов можно разделить на две подгруппы: изоляты, которые в своих геномах содержат все пять генов вирулентности (сиквенс-типы ST1324, ST1376 и ST1434), и изоляты, в геномах которых отсутствует ген *lvh* (сиквенс-типы ST1326 и ST1354). Изоляты ST1324, ST1376 и ST1434 представлены в базе данных по SBT-типированию 15, 2 и 3 изолятами соответственно. Сиквенс-типы ST1324 были выделены в 6 странах: Великобритании, Канаде, Германии, Франции и Китае, изоляты ST1434 – в Чехии и Китае, изоляты ST1376 – в Германии (табл. 4). Все три сиквенс-типа *L. pneumophila* были определены у изолятов, выделенных как из клинического материала, так и из объектов внешней среды. Полученные нами данные о свойствах изолятов ST1324, ST1376 и ST1434, выделенных в г. Сочи, и сведения об этих сиквенс-типах, представленные в базе данных, говорят об их патогенном потенциале для человека, хотя знания об этих сиквенс-типах, особенно ST1376 и ST1434, на сегодня весьма ограничены. Изоляты *L. pneumophila* ST1326, ST1354, не имеющие гена вирулентности *lvh*, представлены в базе данных по SBT-типированию, соответственно, 7 и 13 изолятами, выделенными из объектов внешней среды и из клинического материала (табл. 4). Поскольку в изолятах этих сиквенс-типов отсутствует ген вирулентности *lvh*, судить об их патогенном потенциале не представляется возможным.

При генотипировании шести изолятов *L. pneumophila*, выделенных в других регионах РФ (табл. 3) показано, что два из них (3М из г. Ростова-на-Дону и 6С из г. Санкт-Петербурга) принадлежали к сиквенс-типу ST1, изолят 5Х из г. Калинин-

града – к сиквенс-типу ST252. Изолят 4К, выделенный в г. Хабаровске, отнесен к сиквенс-типу ST366, но, в отличие от изолятов ST366, выделенных в г. Сочи, к серогруппе 1, так же как изоляты этого сиквенс-типа, выделенные в других странах. Изолят 2Р из г. Ростова-на-Дону принадлежал к новому сиквенс-типу ST2813, зарегистрированному нами в базе данных по SBT-типированию *L. pneumophila* под номером EULV13044. У изолята 1Р из г. Мурманска установить сиквенс-тип не удалось (табл. 2). Изоляты 6С, 5Х, 4К и 2Р сиквенс-типов ST1, ST252, ST366 и нового сиквенс-типа ST2813 отнесены к серогруппе 1, а изолят 3М сиквенс-типа ST1 – к серогруппе 2–14. Изоляты всех сиквенс-типов, за исключением ST252, в своих геномах содержали все пять детектируемых генов вирулентности, тем не менее вирулентными для морских свинок оказались лишь изоляты серогруппы 1, в том числе изолят сиквенс-типа ST252, не имеющий гена *lvh*. Вирулентность изолята ST252 для морских свинок говорит об отсутствии прямой связи между наличием в штамме гена вирулентности *lvh* и его патогенностью для морских свинок. Все 6 описанных изолятов, в том числе изолят нового сиквенс-типа ST2813, были способны формировать в условиях *in vitro* биопленки, эта способность в наибольшей степени была выражена у изолята сиквенс-типа 1, выделенного в г. Санкт-Петербурге. Каждый из 6 изолятов имел специфичный только для него RAPD-генотип. Учитывая данные о свойствах изолятов 3М, 6С и 4К, относящихся к сиквенс-типам ST1 и ST366 и принадлежащих к серогруппе 1, а также сведения об этих сиквенс-типах в базе данных по SBT-типированию *L. pneumophila*, можно говорить о потенциальной опасности их для человека. Изоляты ST252, согласно базе данных по SBT-типированию *L. pneumophila* на 12 июля 2019 г., выделены в четырех странах (США, Тайвань, Франция и Нидерланды) и представлены 7 штаммами, шесть из которых являются клиническими. Выделенный нами изолят ST252 серогруппы 1, как мы уже отмечали, хотя и был вирулентным для морских свинок, но у него отсутствовал важный для легионелл ген вирулентности *lvh*, поэтому судить о его патогенном потенциале для людей сложно. Свойства изолята нового сиквенс-типа ST2813 серогруппы 1 также предполагают наличие у него патогенного потенциала для человека, хотя только дальнейшие исследования могут подтвердить или опровергнуть этот прогноз.

Проведенный нами анализ литературных данных по SBT-типированию *L. pneumophila* в РФ показывает, что за весь период наблюдений (2005–2019 гг.) в нашей стране было детектировано 66 разных сиквенс-типов *L. pneumophila*, из которых только 8 были выделены из клинического материала. Наибольшее число сиквенс-типов выявлено в УФО ($n = 43$), в ЦФО и ЮФО было выявлено 15 и 9 сиквенс-типов соответственно (рис. 3). Примечательно, что перечень *L. pneumophila* разных сиквенс-типов, выделенных в этих регионах, сильно различался. Этот факт позволяет высказать предположение, что географическое расположение региона, его климатические условия оказывают существенное влияние на генетическое разнообразие формирующихся в регионах популяций *L. pneumophila*, в том числе на состав (набор) сиквенс-типов.

Одновременное использование для генотипирования *L. pneumophila* двух методов – SBT и RAPD-типирования –

позволило нам выявить интересный факт: изоляты одного и того же сиквенс-типа и одной и той же серогруппы, но выделенные в разных регионах РФ, не были генетически идентичными, они принадлежали к разным RAPD-генотипам. Так, изоляты сиквенс-типа ST1 ($n = 6$) серогруппы 1, выделенные из образцов воды систем горячего водоснабжения г. Сочи, отнесены к RAPD-генотипу А, в то время как изолят этого же сиквенс-типа и этой же серогруппы, но выделенный в г. Санкт-Петербурге, принадлежал к RAPD-генотипу H2; к третьему RAPD-генотипу отнесен изолят сиквенс-типа ST1 серогруппы 2–14, выделенный в г. Ростове-на-Дону. Генетически различаются и изоляты сиквенс-типа ST366 серогруппы 2–14, выделенные в г. Сочи, среди которых 6 изолятов имели RAPD-генотип С1, а два – С3; другой RAPD-генотип (G3) имел изолят ST366 серогруппы 1, выделенный в г. Хабаровск. Каковы генетические отличия изолятов *L. pneumophila*, имеющих один и тот же сиквенс-тип, но различающихся по RAPD-генотипу, и как эти отличия могут влиять на их биологические свойства, в том числе на их патогенный потенциал для человека, вероятно, можно будет понять после биоинформатического анализа результатов полногеномного секвенирования таких изолятов.

Основной причиной циркулирования *L. pneumophila* в системах горячего водоснабжения г. Сочи, вероятнее всего, явилась сравнительно невысокая температура воды в них (диапазон температур составлял от 28 до 61°C) (табл. 1), которая была вполне благоприятной для роста и размножения легионелл. Об этом свидетельствует тот факт, что последующее повышение температуры горячей воды в г. Сочи до 80°C позволило освободить системы горячего водоснабжения от легионелл [34]. Мониторинг *L. pneumophila* в системах горячего водоснабжения, изучение принадлежности их к серогруппе и сиквенс-типу позволяет с большей долей вероятности оценить патогенный потенциал выделенных легионелл и провести необходимые мероприятия по их элиминации из водных источников, предупредив тем самым возможное возникновение легионеллезной инфекции.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the branch program of Rospotrebnadzor

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Онищенко ГГ, Покровский ВИ, Тартаковский ИС, Малеев ВВ, Лазикова ГФ, Чистякова ГГ, и др. Современные взгляды на эпидемиологию легионеллеза: алгоритм действия при эпидемических вспышках и профилактическом мониторинге. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2008;2:1-10.
2. Онищенко ГГ, Демина ЮВ, Тартаковский ИС. Современная концепция организации эпидемиологического надзора за легионеллезной инфекцией. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2009;5:85-91.
3. Тартаковский ИС, Гинцбург АЛ, Лазикова ГФ, Чистякова ГГ, Демина ЮВ, Карпова ТИ, и др. Стандарты лабораторной диагностики легионеллеза и их применение во время эпидемической вспышки пневмоний в г. Верхняя Пышма. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2008;2:16-20.
4. Hern LT, Tee WY, Khan TM. *Legionella pneumophila* - the causative agent of Legionnaires' disease. PMMB. 2021;4:1-12.
5. Chambers ST, Slow S, Scott-Thomas A, Murdoch DR. Legionellosis Caused by Non-*Legionella pneumophila* Species, with a Focus on *Legionella longbeachae*. Microorganisms. 2021;9(2):291-8. DOI: 10.3390/microorganisms9020291
6. Gattuso G, Rizzo R, Lavoro A, Spoto V, Porciello G, Montagnese C, et al. Overview of the Clinical and Molecular Features of *Legionella Pneumophila*: Focus on Novel Surveillance and Diagnostic Strategies. Antibiotics (Basel). 2022 Mar 9;11(3):370. DOI: 10.3390/antibiotics11030370
7. Newton HJ, Ang DK, van Driel IR, Hartland EL. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. Clin Microbiol Rev. 2010 Apr;23(2):274-98. DOI: 10.1128/CMR.00052-09
8. Keše D, Obreza A, Rojko T, Kišek TC. *Legionella pneumophila*-Epidemiology and Characterization of Clinical Isolates, Slovenia, 2006–2020. Diagnostics (Basel). 2021 Jul 2;11(7):1201. DOI: 10.3390/diagnostics11071201
9. Christensen LM, Sule P, Cirillo SLG, Strain M, Plumlee Q, Adams LG, Cirillo JD. Legionnaires' Disease Mortality in Guinea Pigs Involves the p45 Mobile Genomic Element. J Infect Dis. 2019 Oct 8;220(10):1700-1710. DOI: 10.1093/infdis/jiz340
10. Тартаковский ИС, Синопальников АИ, Демина ЮВ, Груздева ОА. Профилактика легионеллеза как основа для нового направления профилактики нозокомальных инфекций. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2010;12(4):273-283.
11. Borella P, Montagna MT, Stampi S, Stancanelli G, Romano-Spica V, Triassi M, et al. *Legionella* contamination in hot water of Italian hotels. Appl Environ Microbiol. 2005 Oct;71(10):5805-13. DOI: 10.1128/AEM.71.10.5805-5813.2005
12. Sciuto EL, Laganà P, Filice S, Scalese S, Libertino S, Corso D, et al. Environmental Management of *Legionella* in Domestic Water Systems: Consolidated and Innovative Approaches for Disinfection Methods and Risk Assessment. Microorganisms. 2021 Mar 11;9(3):577. DOI: 10.3390/microorganisms9030577
13. Segal G, Russo JJ, Shuman HA. Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila*. Mol Microbiol. 1999 Nov;34(4):799-809. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01642.x.
14. Cirillo SL, Bermudez LE, El-Etr SH, Duhamel GE, Cirillo JD. *Legionella pneumophila* entry gene *rtxA* is involved in virulence. Infect Immun. 2001 Jan;69(1):508-17. DOI: 10.1128/IAI.69.1.508-517.2001
15. Fernandez RC, Logan SM, Lee SH, Hoffman PS. Elevated levels of *Legionella pneumophila* stress protein Hsp60 early in infection of human monocytes and L929 cells correlate with virulence. Infect Immun. 1996 Jun;64(6):1968-76. DOI: 10.1128/iai.64.6.1968-1976.1996.
16. Cianciotto NP, Eisenstein BI, Mody CH, Toews GB, Engleberg NC. A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. Infect Immun. 1989 Apr;57(4):1255-62. DOI: 10.1128/iai.57.4.1255-1262.1989
17. Talapko J, Frauenheim E, Juzbašić M, Tomas M, Matić S, Jukić M, et al. *Legionella pneumophila*-Virulence Factors and the Possibility of Infection in Dental Practice. Microorganisms. 2022 Jan 24;10(2):255. DOI: 10.3390/microorganisms10020255
18. Chauhan D, Shames SR. Pathogenicity and Virulence of *Legionella*: Intracellular replication and host response. Virulence. 2021 Dec;12(1):1122-44. DOI: 10.1080/21505594.2021.1903199
19. Pancer K. Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* strains isolated from hospital water distribution systems as a complementary element of risk

- assessment of legionellosis in Poland. *Ann Agric Environ Med*. 2013;20(3):436–40.
20. Карпова ТИ, Тартаковский ИС. Особенности эпидемиологии и лабораторной диагностики легионеллеза. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2015;4(13):51–58.
 21. Тартаковский ИС, Галстян ГМ, Карпова ТИ, Катрыш СА, Дронина ЮЕ, Садретдинова ОВ. Методические особенности диагностики легионеллезной пневмонии в лечебно-профилактических учреждениях. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2012;14(2):100–6.
 22. Карпова ТИ, Дронина ЮЕ, Тартаковский ИС, Романова ЮМ, Гинцбург АЛ. Природные биопленки легионелл и их роль в эпидемиологии инфекции: методы изучения и моделирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2008;2:13–6.
 23. Rodrigues LB, Dos Santos LR, Tagliari VZ, Rizzo NN, Trenhago G, de Oliveira AP, et al. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. *Braz J Microbiol*. 2010 Oct;41(4):1082–5. DOI: 10.1590/S1517-838220100004000029
 24. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington (DC): National Academy Press., Copyright 1996. ISBN 0-309-05377-3
 25. Zimmer M, Barnhart H, Idris U, Lee MD. Detection of *Campylobacter jejuni* strains in the water lines of a commercial broiler house and their relationship to the strains that colonized the chickens. *Avian Dis*. 2003 Jan-Mar;47(1):101–7. DOI: 10.1637/0005-2086(2003)047[0101:DOCJSI]2.0.CO;2
 26. Quero S, Párraga-Niño N, Sabria M, Barrabeig I, Sala MR, Jané M, et al. *Legionella* SBT applied directly to respiratory samples as a rapid molecular epidemiological tool. *Sci Rep*. 2019 Jan 24;9(1):623. DOI: 10.1038/s41598-018-36924-w
 27. Tamura K, Stecher G, Peterson D, FilipSKI A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013 Dec;30(12):2725–9. DOI: 10.1093/molbev/mst197
 28. Yong SF, Tan SH, Wee J, Tee JJ, Sansom FM, Newton HJ, Hartland EL. Molecular Detection of *Legionella*: Moving on From mip. *Front Microbiol*. 2010 Nov 11;1:123. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00123
 29. Воронина ОЛ, Кунда МС, Лунин ВГ, Карпова ТИ, Тартаковский ИС. Молекулярно-генетическое типирование штаммов *Legionella pneumophila* и *Legionella* spp., выделенных на территории Российской Федерации. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2008;10(2):154–62.
 30. Тартаковский ИС, Адгамов РР, Ермолаева СА, Дронина ЮЕ, Карпова ТИ, Галстян ГМ, и др. Методические особенности диагностики легионеллезной пневмонии в лечебно-профилактических учреждениях. Часть 2. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2013;15(3):166–72.
 31. Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. Addition of *neuA*, the gene encoding N-acylneuraminate cytidyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol*. 2007 Jun;45(6):1965–8. DOI: 10.1128/JCM.00261-07
 32. Rousseau C, Ginevra C, Simac L, Fiard N, Vilhes K, Ranc AG, et al. A Community Outbreak of Legionnaires' Disease with Two Strains of *L. pneumophila* Serogroup 1 Linked to an Aquatic Therapy Centre. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Jan 20;19(3):1119. DOI: 10.3390/ijerph19031119
 33. Zhan XY, Zhu QY. Molecular typing of *Legionella pneumophila* isolates from environmental water samples and clinical samples using a five-gene sequence typing and standard Sequence-Based Typing. *PLoS One*. 2018; 13(2):e0190986. DOI: 10.1371/journal.pone.0190986
 34. Кузькин БП, Куличенко АН, Волынкина АС, Ефременко ДВ, Кузнецова ИВ, Котенев ЕС, и др. Применение современных методов генотипирования возбудителей инфекционных болезней в условиях оперативной работы специализированной противозидемической бригады в период проведения XXII Олимпийских Зимних Игр и XI Паралимпийских Зимних Игр. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015;2:119–22.
- ## References
1. Onishchenko GG, Pokrovsky VI, Tartakovskii IS, Maleev VV, Lazikova GF, Chistyakova GG, et al. Modern views on the epidemiology of legionellosis: operations procedure during epidemic outbreaks and preventive monitoring. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2008;2:1–10. (In Russian).
 2. Onischenko GG, Demina YuV, Tartakovskiy IS. Modern conception of organization of epidemiological surveillance for legionella infections. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2009;5:85–91. (In Russian).
 3. Tartakovskii IS, Ginzburg AL, Lazikova GF, Chistyakova GG, Demina YuV, Karpova TI, et al. Standards for laboratory diagnostics of legionellosis and their application during epidemic outbreak of pneumonia in town Verkhnyaya Pyshma. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2008;2:16–20. (In Russian).
 4. Hern LT, Tee WY, Khan TM. *Legionella pneumophila* – the causative agent of Legionnaires' disease. *PMMB*. 2021;4:1–12.
 5. Chambers ST, Slow S, Scott-Thomas A, Murdoch DR. Legionellosis Caused by Non-*Legionella pneumophila* Species, with a Focus on *Legionella longbeachae*. *Microorganisms*. 2021;9(2):291–8. DOI: 10.3390/microorganisms9020291
 6. Gattuso G, Rizzo R, Lavoro A, Spoto V, Porciello G, Montagnese C, et al. Overview of the Clinical and Molecular Features of *Legionella pneumophila*: Focus on Novel Surveillance and Diagnostic Strategies. *Antibiotics (Basel)*. 2022 Mar 9;11(3):370. DOI: 10.3390/antibiotics11030370
 7. Newton HJ, Ang DK, van Driel IR, Hartland EL. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clin Microbiol Rev*. 2010 Apr;23(2):274–98. DOI: 10.1128/CMR.00052-09
 8. Keše D, Obreza A, Rojko T, Kišek TC. *Legionella pneumophila* – Epidemiology and Characterization of Clinical Isolates, Slovenia, 2006–2020. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Jul 2;11(7):1201. DOI: 10.3390/diagnostics11071201
 9. Christensen LM, Sule P, Cirillo SLG, Strain M, Plumlee Q, Adams LG, Cirillo JD. Legionnaires' Disease Mortality in Guinea Pigs Involves the p45 Mobile Genomic Element. *J Infect Dis*. 2019 Oct 8;220(10):1700–1710. DOI: 10.1093/infdis/jiz340
 10. Tartakovskiy IS, Sinopalnikov AI, Demina YuV, Gruzdeva OA. Prevention of legionellosis as a basis for the new approach to prophylaxis of hospital-acquired infections. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2010;12(4):273–283. (In Russian).
 11. Borella P, Montagna MT, Stampi S, Stancanelli G, Romano-Spica V, Triassi M, et al. Legionella contamination in hot water of Italian hotels. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Oct;71(10):5805–13. DOI: 10.1128/AEM.71.10.5805-5813.2005
 12. Sciuto EL, Laganà P, Filice S, Scalese S, Libertino S, Corso D, et al. Environmental Management of *Legionella* in Domestic Water Systems: Consolidated and Innovative Approaches for Disinfection Methods and Risk Assessment. *Microorganisms*. 2021 Mar 11;9(3):577. DOI: 10.3390/microorganisms9030577
 13. Segal G, Russo JJ, Shuman HA. Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol*. 1999 Nov;34(4):799–809. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01642.x
 14. Cirillo SL, Bermudez LE, El-Etr SH, Duhamel GE, Cirillo JD. *Legionella pneumophila* entry gene *rtxA* is involved in virulence. *Infect Immun*. 2001 Jan;69(1):508–17. DOI: 10.1128/IAI.69.1.508-517.2001
 15. Fernandez RC, Logan SM, Lee SH, Hoffman PS. Elevated levels of *Legionella pneumophila* stress protein Hsp60 early in infection of human monocytes and L929 cells correlate with virulence. *Infect Immun*. 1996 Jun;64(6):1968–76. DOI: 10.1128/iai.64.6.1968-1976.1996
 16. Cianciotto NP, Eisenstein BI, Mody CH, Toews GB, Engleberg NC. A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. *Infect Immun*. 1989 Apr;57(4):1255–62. DOI: 10.1128/iai.57.4.1255-1262.1989
 17. Talapko J, Frauenheim E, Juzbašić M, Tomas M, Matić S, Jukić M, et al. *Legionella pneumophila* – Virulence Factors and the Possibility of Infection in Dental Practice. *Microorganisms*. 2022 Jan 24;10(2):255. DOI: 10.3390/microorganisms10020255

18. Chauhan D, Shames SR. Pathogenicity and Virulence of *Legionella*: Intracellular replication and host response. Virulence. 2021 Dec;12(1):1122-44. DOI: 10.1080/21505594.2021.1903199
19. Pancer K. Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* strains isolated from hospital water distribution systems as a complementary element of risk assessment of legionellosis in Poland. Ann Agric Environ Med. 2013;20(3):436-40.
20. Karpova TI, Tartakovskiy IS. The features of epidemiology and laboratory diagnostics of legionellosis. Infectious Diseases. News, Opinions, Training. 2015;4(13):51-58. (In Russian).
21. Tartakovskiy IS, Galstyan GM, Karpova TI, Katrysh SA, Dronina YuE, Sadretdinova OV. Methodology issues of legionella pneumonia diagnosis in medical institutions. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2012;14:100-6. (In Russian).
22. Karpova TI, Dronina YuE, Tartakovskii IS, Romanova YuM, Clnzburg AL. Legionella natural biofilms and their role in epidemiology of the infection: methods of study and modelling. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2008;2:13-6. (In Russian).
23. Rodrigues LB, Dos Santos LR, Tagliari VZ, Rizzo NN, Trenhago G, de Oliveira AP, et al. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. Braz J Microbiol. 2010 Oct;41(4):1082-5. DOI: 10.1590/S1517-838220100004000029
24. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington (DC): National Academy Press., Copyright 1996. ISBN 0-309-05377-3
25. Zimmer M, Barnhart H, Idris U, Lee MD. Detection of *Campylobacter jejuni* strains in the water lines of a commercial broiler house and their relationship to the strains that colonized the chickens. Avian Dis. 2003 Jan-Mar;47(1):101-7. DOI: 10.1637/0005-2086(2003)047[0101:DOCJSI]2.0.CO;2
26. Quero S, Párraga-Niño N, Sabria M, Barrabeig I, Sala MR, Jané M, et al. *Legionella* SBT applied directly to respiratory samples as a rapid molecular epidemiological tool. Sci Rep. 2019 Jan 24;9(1):623. DOI: 10.1038/s41598-018-36924-w
27. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 2013 Dec;30(12):2725-9. DOI: 10.1093/molbev/mst197
28. Yong SF, Tan SH, Wee J, Tee JJ, Sansom FM, Newton HJ, Hartland EL. Molecular Detection of *Legionella*: Moving on From mip. Front Microbiol. 2010 Nov 11;1:123. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00123
29. Voronina OL, Kunda MS, Lunin VG, Karpova TI, Tartakovskii IS. Molecular and genetic typing of *Legionella pneumophila* and *Legionella* spp. strains isolated in the Russian Federation. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2008;10(2):154-62. (In Russian).
30. Tartakovskiy IS, Adgamov RR, Ermolaeva SA, Dronina YuE, Karpova TI, Galstyan GM, et al. Methodology issues of legionella pneumonia diagnosis in medical institutions (part 2). Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2013;15(3):166-72. (In Russian).
31. Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. Addition of *neuA*, the gene encoding N-acylneuraminate cytidyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. J Clin Microbiol. 2007 Jun;45(6):1965-8. DOI: 10.1128/JCM.00261-07
32. Rousseau C, Ginevra C, Simac L, Fiard N, Vilhes K, Ranc AG, et al. A Community Outbreak of Legionnaires' Disease with Two Strains of *L. pneumophila* Serogroup 1 Linked to an Aquatic Therapy Centre. Int J Environ Res Public Health. 2022 Jan 20;19(3):1119. DOI: 10.3390/ijerph19031119
33. Zhan XY, Zhu QY. Molecular typing of *Legionella pneumophila* isolates from environmental water samples and clinical samples using a five-gene sequence typing and standard Sequence-Based Typing. PLoS One. 2018; 13(2):e0190986. DOI: 10.1371/journal.pone.0190986
34. Kuzkin BP, Kulichenko AN, Volynkina AS, Efremenko DV, Kuznetsova IV, Kotenev ES, et al. Modern methods application of genotyping of infectious diseases pathogens in the context of operational work of specialized anti-epidemic team during the XXII Olympic Winter Games and XI Paralympic Winter Games. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2015;2:119-22. (In Russian).

Информация о соавторах:

Светоч Эдуард Арсеньевич, доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Асташкин Евгений Ильич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
E-mail: ast.ev@mail.ru

Ерусланов Борис Васильевич, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
E-mail: eruslanov@obolensk.org

Мицевич Ирина Петровна, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
E-mail: mitzevich_i_p@obolensk.org

Карцев Николай Николаевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
E-mail: kartsev@obolensk.org

Попова Анастасия Владимировна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
E-mail: popova_nastya86@mail.ru

Коробова Ольга Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
E-mail: korobova@obolensk.org

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

Information about co-authors:

Edward A. Svetoch, PhD, DSc (Veterinary Sciences) Professor, Chief Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Evgeny I. Astashkin, MD, PhD, Leading Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Boris V. Eruslanov, MD, PhD, DSc, Leading Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Irina P. Mitzevich, Senior Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Nikolay N. Kartsev, MD, PhD, Senior Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Anastasiya V. Popova, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher of the Laboratory for Molecular Diagnostics and Genetically Engineered Drugs, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Olga V. Korobova, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher of the Laboratory for Biological Trials, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Ivan A. Dyatlov, Academician of RAS, MD, PhD, DSc, Professor, Director of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Протекторное действие супернатантов лизатов реликтовых бактерий *Bacillus* sp. из вечной мерзлоты на ДНК лейкоцитов крови лабораторных мышей (посвящается памяти Потапова В.Д.)

М.В.Аверин¹, М.Б.Бородулин¹, А.Б.Галеев^{1,2}, Г.И.Грива¹, Н.С.Захарченко³, С.Г.Игнатов⁴, В.П.Мельников^{1,5}, В.Д.Потапов⁴, Е.Б.Рукавцова⁴, Р.Н.Храмов^{1,6}, Т.Г.Щербатюк⁷, А.В.Брушков^{8,9}

¹АНО «Губернская академия», Тюмень, Российская Федерация;

²Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушкино, Российская Федерация;

³Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Пушкино, Российская Федерация;

⁴ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация;

⁵Институт криосферы Земли – обособленное структурное подразделение ФГБУН ФИЦ «Тюменский научный центр» СО РАН, Тюмень, Российская Федерация;

⁶ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» РАН, Пушкино, Российская Федерация;

⁷ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Российская Федерация;

⁸ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова», Москва, Российская Федерация;

⁹ФГАОУ ВО «Тюменский государственный университет», Тюмень, Российская Федерация

В последние десятилетия наблюдается повышенный интерес как к известным пробиотикам, так и к новым источникам, раскрытие потенциала которых позволит сохранить и поддержать здоровье. С помощью современного метода молекулярной геноксикологии «комета-тест» исследовано защитное действие метабитиков и/или лизатов реликтовых бактерий *Bacillus* sp., выделенных из вечной мерзлоты Центральной Якутии, на ДНК лейкоцитов периферической крови лабораторных мышей. Из бактериальных культур получали лизаты после обработки с помощью Френч-пресса или ультразвука в выбранных режимах. Лейкоциты крови мыши инкубировали в течение 20 мин при 37°C в присутствии супернатантов лизатов либо нативных клеток и подвергали нагрузочному тесту (пероксид водорода в концентрации 20 мкМ в течение 10 мин при 37°C).

Обнаружено, что уровень повреждений ДНК в присутствии супернатантов лизатов в среднем достоверно (на 40%) меньше по сравнению с контролем (инкубация в фосфатном буфере) и по сравнению с инкубацией в супернатанте от нативных бактерий (метабитик), который не показал защитного действия. Показано, что защитный эффект сохранялся при разведении супернатантов лизатов *Bacillus* sp. в 18 раз, а его величина линейно зависела от длительности инкубации (10–40 мин). Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения лизатов *Bacillus* sp. в биомедицине.

Ключевые слова: Bacillus sp., лизаты бактерий, ДНК лейкоцитов, протекторное действие

Для цитирования: Аверин М.В., Бородулин М.Б., Галеев А.Б., Грива Г.И., Захарченко Н.С., Игнатов С.Г., Мельников В.П., Потапов В.Д., Рукавцова Е.Б., Храмов Р.Н., Щербатюк Т.Г., Брушков А.В. Протекторное действие супернатантов лизатов реликтовых бактерий *Bacillus* sp. из вечной мерзлоты на ДНК лейкоцитов крови лабораторных мышей (посвящается памяти Потапова В.Д.). Бактериология. 2022; 7(4): 24–33. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-24-33

Для корреспонденции:

Игнатов Сергей Георгиевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией нанобиотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 360-046
E-mail: ignatov@obolensk.org

Статья поступила 12.11.2022 г., принята к печати 28.12.2022 г.

For correspondence:

Sergey G. Ignatov, PhD, DSc (Biological Sciences), Chief Researcher, Laboratory of Nanobiotechnology, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 360-046
E-mail: ignatov@obolensk.org

The article was received 12.11.2022, accepted for publication 28.12.2022

Protective action of supernatant lysates of relict bacteria *Bacillus* sp. from permafrost on the blood leukocytes DNA of laboratory mice (dedicated to the memory of Potapov V.D.)

M.V.Averin¹, M.B.Borodulin¹, A.B.Gapeev^{1,2}, G.I.Griva², N.S.Zakharchenko³, S.G.Ignatov⁴, V.P.Melnikov^{1,5},
V.D.Potapov⁴, E.B.Rukavtsova⁴, R.N.Khramov^{1,6}, T.G.Shcherbatyuk⁷, A.V.Brouchkov^{8,9}

¹Autonomous non-profit organization «Provincial Academy», Tyumen, Russian Federation;

²Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences – a separate subdivision of the Federal Research Center «Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences», Pushchino, Russian Federation;

³Branch of the Academicians M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation;

⁴State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

⁵Institute of Earth Cryosphere Tyumen Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences;

⁶Institute for Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation;

⁷Nizhny Novgorod Research Institute of Hygiene and Occupational Pathology of Rospotrebnadzor, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

⁸Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;

⁹Tyumen State University, Tyumen, Russian Federation

In recent decades, there has been an increased interest in both known probiotics and new sources, the disclosure of the potential of which will preserve and maintain human health. The protective effect of metabiotics and/or lysates of relict bacteria *Bacillus* sp., isolated from the permafrost of Central Yakutia, on the DNA of peripheral blood leukocytes of laboratory mice was studied using the modern method of molecular genotoxicology «comet-test». Lysates were obtained from bacterial cultures after treatment with a French press or ultrasound in the selected modes. Mouse blood leukocytes were incubated for 20 min at 37°C in the presence of lysate supernatants or native cells, and subjected to a stress test (hydrogen peroxide at a concentration of 20 µM for 10 min at 37°C).

It was found that the level of DNA damage in the presence of lysate supernatants was on average significantly lower by 40% compared with the control (incubation in phosphate buffer) and compared with incubation in the supernatant from native bacteria (metabiotic), which did not show a protective effect. It was shown that the protective effect was preserved when the supernatants of *Bacillus* sp. lysates were diluted. 18 times, and its value linearly depended on the duration of incubation for 10–40 minutes. The results obtained indicate the prospects for the use of lysates of *Bacillus* sp. in biomedicine.

Key words: *Bacillus* sp., bacterial lysates, leukocyte DNA, protective effect

For citation: Averin M.V., Borodulin M.B., Gapeev A.B., Griva G.I., Zakharchenko N.S., Ignatov S.G., Melnikov V.P., **Potapov V.D.**, Rukavtsova E.B., Khramov R.N., Shcherbatyuk T.G., Brouchkov A.V. Protective action of supernatant lysates of relict bacteria *Bacillus* sp. from permafrost on the blood leukocytes DNA of laboratory mice (dedicated to the memory of Potapov V.D.). *Bacteriology*. 2022; 7(4): 24–33. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-24-33

Плезные свойства пробиотиков для улучшения здоровья, модуляции иммунной системы, лечения целого ряда заболеваний большинством исследователей считаются установленными [1, 2]. Однако существует и противоположное мнение, что пробиотики полезны только для желудочно-кишечного тракта, в то время как их эффект на целостный организм преувеличен [3]. В последнее время появились сведения о феноменальной жизнеспособности некоторых бактерий из древней каменной соли [4], янтаря [5] и вечной мерзлоты [6], возраст которых достигает десятков и даже сотен миллионов лет [7]. Вероятно, такие бактерии способны защищать геном в течение своего продолжительного существования [8, 9]. Есть предположение, что такие бактерии могут быть полезны в геронтологии [10].

Цель нашей работы состояла в оценке возможности защитного действия metabiотиков и/или лизатов реликтовых бактерий *Bacillus* sp., выделенных из вечной мерзлоты Центральной Якутии [11], на ДНК лейкоцитов крови лабора-

торных животных. Параллельно решались задачи оптимизации условий культивирования бактерий для последующего получения metabiотиков и лизатов в необходимом объеме, а также способов получения лизатов.

Материалы и методы

Штамм бактерий, условия выращивания

В работе использовали штамм бактерий *Bacillus* sp., полученный из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk». Бактериальную культуру выращивали в жидкой среде LB [12], содержащей бакто-триптон (Difco, США) – 10 г/л, дрожжевой экстракт (Difco, США) – 5 г/л, NaCl – 10 г/л, на орбитальном шейкере при 37°C, 130 об./мин. В качестве агаризованной среды для бактерий *Bacillus* sp. использовали рыбнопептонный агар (1 л отвара из 500 г рыбы, 10 г пептона, 5 г NaCl, 15 г агара (Pronadisa, Испания), pH 7,0–7,2, автоклавирование при 121°C 20 мин).

Животные

В работе использовали лабораторных мышей линии BALB/c.

Определение кривых роста бактерий *Bacillus* sp.

Бактериальную культуру *Bacillus* sp. выращивали в течение 3 суток в жидкой среде LB на орбитальном шейкере при 37°C, 130 об./мин. Вначале вносили 1 мл ночной культуры с титром 1×10^{11} КОЕ/мл в 100 мл жидкой среды LB. Оптическую плотность культуры определяли при 600 нм на спектрофотометре SHIMADZU UV-1800 (Япония). Для подсчета колоний периодически отбирали пробы, разводили культуру в 10^6 раз жидкой средой LB, шпателем втирали разведения в чашки Петри с агаризованной средой РПА по 100 и 200 мкл. Определяли КОЕ (количество колониеобразующих единиц) в 1 мл культуры бактерий по формуле: (число колоний, выросших после разведения \times коэффициент разведения) / объем разведенной суспензии для посева. Параллельно для некоторых точек роста было определено количество клеток в культуральной жидкости на цитофлуориметре NovoCyte (Agilent, США).

Приготовление лизатов бактерий *Bacillus* sp.

После культивирования и разведения биомассы в фосфатном буфере (ФБ) в 6 раз (136,7 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 8,1 мМ Na₂HPO₄, 1,5 мМ KH₂PO₄, pH = 7,2) бактерии *Bacillus* sp. были высеяны для подсчета клеток в чашки Петри на среду РПА. Полученная биомасса может храниться в замороженном виде при -20°C как минимум в течение 8 мес. без потери свойств. Для приготовления лизатов бактерий часть клеток в ФБ была разрушена на Френч-прессе (ИБФМ РАН, Пущино, Россия) при 2000 атм. Другую часть клеток в ФБ разрушали ультразвуком (20 кГц, 30-секундная обработка ультразвуком с минутным интервалом между тремя повторами) при интенсивности до 1 кДж на аппарате Sonicator (QSonica, США). С помощью центрифугирования (3 мин при 10000 об./мин, центрифуга MiniSpin, Германия) получены супернатанты, содержащие экстра- и внутриклеточные метаболиты бактерий, но не содержащие сами бактерии и их обломки. Микроскопическое исследование лизатов бактерий *Bacillus* sp. проводили на световом микроскопе Zeiss Axio Imager A1 (Zeiss, Германия), для фотографирования использовали фотокамеру AxioCam 506C camera (Zeiss, Германия).

Метод ДНК-комет (comet assay)

Были приготовлены микроскопные слайды из трех слоев 0,5%-й легкоплавкой агарозы (Serva, Германия) с лейкоцитами из периферической крови мышей, иммобилизованными в средний слой. Далее проводили процедуры «коматеста»: лизис клеток в лизирующем растворе (1%-й лаурилсаркозинат натрия, 2,5 М NaCl, 0,1 М ЭДТА, 0,01 М трис-HCl, pH 10 и 1%-й Тритон X-100) в течение 25 мин при 37°C; щелочная денатурация ДНК в щелочном растворе (0,3 М NaOH, 0,001 М ЭДТА, pH >13) в течение 20 мин при 4°C; электрофорез в свежей порции щелочного раствора в течение 20 мин при 4°C в электрофоретической камере SE-1/S-1N (ООО «Компания Хеликон», Москва) при напряженности электрического поля 2 В/см и силе тока 300 мА; ренатурация

ДНК при нормальном pH; окрашивание ДНК в ФБ, содержащем 1 мкг/мл бромистого этидия, в течение 1 ч. Перед анализом каждый слайд в течение 5 мин промывали в дистиллированной воде и накрывали покровным стеклом. Все процедуры проводили при искусственном освещении с использованием ламп накаливания во избежание возникновения дополнительных повреждений ДНК в клетках. Препараты анализировали с использованием аппаратно-программного комплекса «Комет Эксперт» (ООО «Ген Эксперт», Пущино). В качестве индикатора величины поврежденности ДНК использовали процентное содержание ДНК в «хвосте кометы» (%ТДНК) [13]. Из каждого образца крови готовили необходимое число слайдов в соответствии с числом воздействий. На каждом слайде регистрировали по 30–50 изображений «комет», по которым рассчитывали средний уровень %ТДНК. Средние значения и стандартные ошибки среднего для каждого варианта воздействия вычисляли по результатам независимых экспериментов ($n \geq 9$).

Анализ генотоксического действия пероксида водорода при использовании супернатантов бактерий *Bacillus* sp.

С использованием супернатантов бактерий *Bacillus* sp. и супернатантов их лизатов проведена серия экспериментов (при разведении супернатантов в 6 раз) с лейкоцитами крови мыши методом ДНК-комет по следующему протоколу. К 40 мкл раствора (в 4 вариантах: ФБ, супернатант от нативных бактерий, супернатант от бактерий после Френч-пресса, супернатант от бактерий после обработки ультразвуком) добавляли 1,5 мкл периферической крови мыши, взятой из хвостовой вены, инкубировали 20 мин при 37°C. Далее готовили микроскопные агарозные слайды для метода ДНК-комет (по 3 слайда после каждого варианта инкубации). Готовые препараты инкубировали в присутствии генотоксического агента – 20 мкМ пероксида водорода (нагрузочный тест) в течение 10 мин при 37°C.

Анализ зависимости защитного эффекта супернатантов бактерий *Bacillus* sp. от длительности экспозиции

К 40 мкл растворов (в 4 вариантах: ФБ, супернатант от нативных бактерий, супернатант лизата, полученного из бактерий с помощью Френч-пресса, супернатант лизата, полученного из бактерий после обработки ультразвуком), добавляли по 1,5 мкл периферической крови мыши, взятой из хвостовой вены, и инкубировали в течение 10, 20 и 40 мин при 37°C. Далее готовили микроскопные агарозные слайды для метода ДНК-комет, по 3 слайда после каждого варианта инкубации. Готовые препараты инкубировали в присутствии 20 мкМ пероксида водорода (нагрузочный тест) в течение 10 мин при 37°C.

Анализ зависимости защитного эффекта от концентрации супернатантов бактерий

Для оценки зависимости защитного эффекта от концентрации супернатантов проведена серия экспериментов (при разведении супернатантов в 18 раз) с лейкоцитами крови мыши методом ДНК-комет по следующему протоколу. К 40 мкл растворов (в 4 вариантах: ФБ, супернатант от нативных бактерий, супернатант от бактерий после Френч-пресса, супернатант от бактерий после обработки ультразвуком)

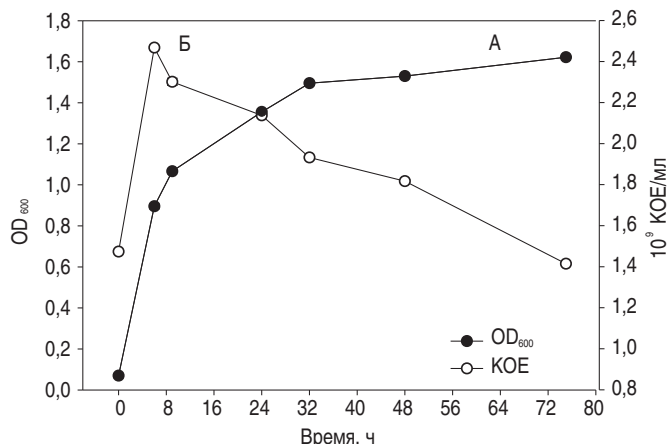


Рис. 1. Рост бактерий *Bacillus* sp. при периодическом культивировании. А – динамика изменения оптической плотности при 600 нм; Б – динамика роста бактерий (КОЕ/мл). Измерения проводили в трех аналитических и трех биологических повторностях. Различия оценивали с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни.

добавляли по 1,5 мкл периферической крови мыши, взятой из хвостовой вены, и инкубировали 20 мин при 37°C. Далее готовили микроскопные агарозные слайды для метода ДНК-комет, по 3 слайда после каждого варианта инкубации. Готовые препараты инкубировали в присутствии 20 мкМ пероксида водорода (нагрузочный тест) в течение 10 мин при 37°C.

Статистический анализ

Все эксперименты проведены по протоколу «слепого контроля», когда экспериментатор, проводивший измерения, не знал, какие воздействия были использованы. Все данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка. Поскольку данные имели нормальное распределение (по тесту Колмогорова–Смирнова), то статистический анализ проводили с использованием ANOVA и критерия Даннета для множественного сравнения ($p < 0,01$), при парном сравнении групп данных использовали t-критерий Стьюдента или U-критерий Манна–Уитни ($p < 0,05$).

Результаты исследований

Первоначально было проведено выращивание бактерий *Bacillus* sp. при оптимальных условиях, установленных нами ранее [14] (жидкая среда LB, 37°C, 130 об./мин). Оптическую

плотность культуры определяли при 600 нм на спектрофотометре в течение 3 суток (рис. 1А). Динамику роста культуры определяли с помощью подсчета колоний на цитофлуориметре NovoCyte (Agilent, США), а также путем посева культуры на чашки Петри. Анализ культивирования исследуемых бактерий показал, что рост замедлялся после максимального накопления биомассы (6 ч) в конце экспоненциальной фазы, затем наблюдалось снижение числа живых бактерий (рис. 1Б). Приведенные графики демонстрируют, что определение количества живых бактерий по оптической плотности не всегда информативно, особенно после экспоненциальной фазы роста.

Полученные данные могут иметь важное значение для оптимизации условий культивирования бактерий *Bacillus* sp. и дальнейшего применения метаболитов и пробиотиков на их основе в прикладных биотехнологических исследованиях и медицине [15].

Для дальнейших экспериментов на лейкоцитах крови лабораторных мышей были приготовлены лизаты бактерий *Bacillus* sp. Часть клеток в ФБ была разрушена на Френч-прессе при 20 атм, другая часть клеток в ФБ была разрушена импульсным ультразвуком. Микроскопическое исследование бактерий *Bacillus* sp. показало, что разрушение клеток с помощью Френч-пресса более эффективно по сравнению с воздействием ультразвука (рис. 2). Это же подтвердилось с помощью высева на чашки Петри со средой РПА. Подсчет колоний показал, что в контрольных неразрушенных образцах количество бактерий составило $4,8 \times 10^7$ КОЕ/мл, после ультразвука – $2,7 \times 10^7$ КОЕ/мл, после Френч-пресса – 1×10^7 КОЕ/мл. С помощью центрифугирования получены супернатанты, содержащие экстра- и внутриклеточные метаболиты бактерий, но не содержащие самих бактерий, спор и их обломков, что подтверждено с помощью световой микроскопии, а также высева на чашки Петри со средой РПА. Эти супернатанты лизатов бактерий использовали в экспериментах по оценке уровня повреждений ДНК в лейкоцитах крови лабораторных мышей.

Ранее нами показано, что предварительное воздействие на лейкоциты крови лабораторных животных определенных агентов (низкие наномолярные концентрации пероксида водорода, низкоинтенсивное электромагнитное излучение крайне высоких частот, оранжево-красный свет) значительно снижало уровень повреждений клеточной ДНК при последующем действии агентов окислительного стресса и ал-

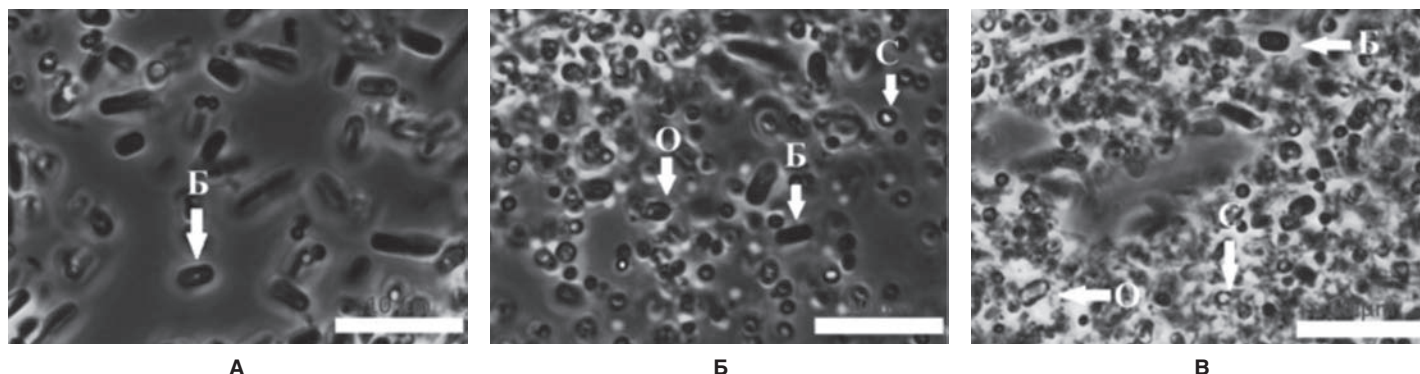


Рис. 2. Микроскопический анализ бактерий *Bacillus* sp. А – контроль (неразрушенные клетки), Б – клетки после обработки ультразвуком, В – клетки после обработки с помощью Френч-пресса. (Увеличение $\times 100$, длина шкалы 10 мкм). Обозначения: Б – бактерии, С – споры, О – обломки клеток.

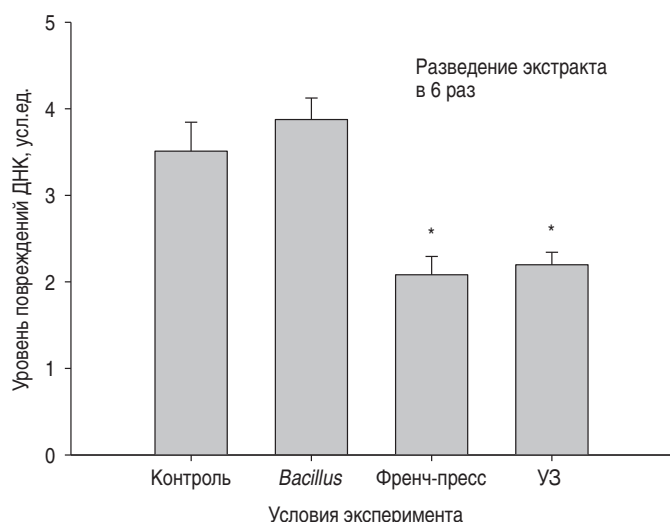


Рис. 3. Уровень повреждений ДНК в лейкоцитах крови мыши после нагрузочного теста (20 мкМ пероксида водорода, 10 мин при 37°C) при инкубации клеток (20 мин при 37°C) в фосфатном буфере (контроль), супернатанте от нативных бактерий *Bacillus* sp., супернатанте от бактерий после Френч-пресса, супернатанте от бактерий после обработки ультразвуком (разведение супернатанта в 6 раз). Указаны достоверные различия по множественному критерию Даннета ($p < 0,002$), $n \geq 9$.

килирующих агентов [16, 17]. В рамках настоящего исследования проверена гипотеза о том, что предварительная обработка лейкоцитов крови метабиотиком и/или лизатом реликтовых бактерий *Bacillus* sp. способна защищать ДНК от повреждающего действия пероксида водорода путем повышения эффективности систем репарации ДНК.

Для оценки уровня повреждений ДНК в лейкоцитах крови лабораторных мышей линии BALB/c использовали современный метод молекулярной генотоксикологии «комета-тест» (метод ДНК-комет, comet assay) [13–18]. Метод основан на анализе картины электрофореза нуклеоидов индивидуальных клеток, ДНК которых окрашена флуоресцентным красителем. Свое название метод получил из-за визуального сходства получаемых электрофореграмм с кометами: наблюдаются яркая флуоресцирующая «голова кометы» и «хвост», образующийся в результате миграции поврежденных или расплетенных участков ДНК после электрофореза в агарозном геле.

Оценка генотоксического действия с использованием метода ДНК-комет показала, что уровень повреждений ДНК в лейкоцитах крови мыши, инкубированных в присутствии супернатантов лизатов, полученных от суспензии бактерий после обработки с помощью Френч-пресса и ультразвука в выбранных режимах в течение 20 мин при 37°C, в нагрузочном тесте (пероксид водорода в концентрации 20 мкМ в течение 10 мин при 37°C) оказывается в среднем достоверно на 40% меньше по сравнению с контролем (инкубация в ФБ) и по сравнению с инкубацией в супернатанте от нативных бактерий ($p < 0,002$ по множественному критерию Даннета) (рис. 3).

Для оценки зависимости защитного эффекта от длительности экспозиции проведена серия экспериментов (при разведении супернатанта в 6 раз) с лейкоцитами крови мыши методом ДНК-комет. Оценка генотоксического действия показала, что уровень повреждений ДНК в лейкоцитах крови мыши, инкубированных в присутствии супернатанта,

полученного от суспензии бактерий *Bacillus* sp. после обработки с помощью Френч-пресса и ультразвука в выбранных режимах в течение 10, 20 и 40 мин при 37°C, в нагрузочном тесте (пероксид водорода в концентрации 20 мкМ в течение 10 мин при 37°C) оказывается в среднем достоверно меньше по сравнению с контролем (инкубация в ФБ) ($p < 0,01$ по множественному критерию Даннета) (рис. 4).

Таким образом, показано наличие защитного эффекта супернатантов лизатов реликтовых бактерий *Bacillus* sp. на ДНК лейкоцитов крови мыши при ее повреждении перокси-

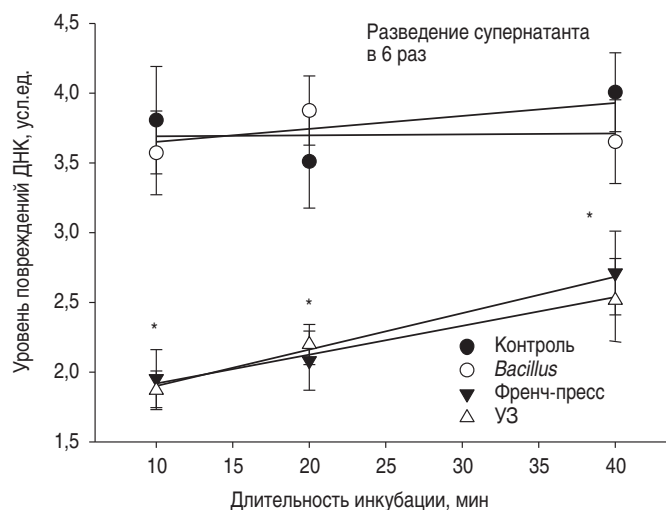


Рис. 4. Зависимость уровня повреждений ДНК в лейкоцитах крови мыши после нагрузочного теста (20 мкМ пероксида водорода, 10 мин при 37°C) от длительности инкубации клеток (10–40 мин при 37°C) в фосфатном буфере (контроль), супернатанте от нативных бактерий *Bacillus* sp., супернатанте от бактерий после Френч-пресса, супернатанте от бактерий после обработки ультразвуком (разведение супернатанта в 6 раз). Указаны достоверные отличия от уровня в контроле по t-критерию Стьюдента, $p < 0,01$, $n \geq 9$.

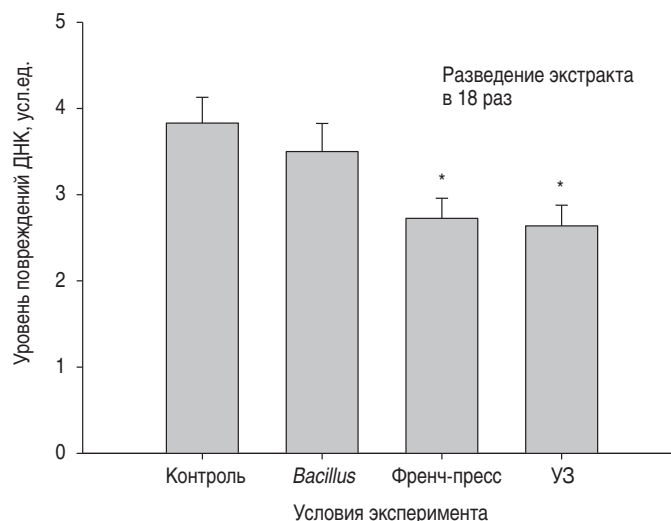


Рис. 5. Уровень повреждений ДНК в лейкоцитах крови мыши после нагрузочного теста (20 мкМ пероксида водорода, 10 мин при 37°C) при инкубации клеток (20 мин при 37°C) в фосфатном буфере (контроль), супернатанте от нативных бактерий *Bacillus* sp., супернатанте от бактерий после Френч-пресса, супернатанте от бактерий после обработки ультразвуком (разведение супернатантов в 18 раз). Указаны достоверные отличия от уровня в контроле по множественному критерию Даннета, $p < 0,01$, $n \geq 9$.

дом водорода в нагрузочном тесте. Величина обнаруженного защитного эффекта линейно зависела от длительности инкубации лейкоцитов в присутствии супернатантов лизатов в течение 10–40 мин. Максимальный защитный эффект составил около 45% при длительности инкубации 10 мин в присутствии супернатантов лизатов бактерий *Bacillus* sp. (рис. 4).

Для анализа зависимости защитного эффекта от концентрации супернатантов проведена серия экспериментов (при разведении супернатантов в 18 раз) с лейкоцитами крови мыши методом ДНК-комет. Оценка генотоксического действия показала, что защитный эффект супернатантов лизатов бактерий *Bacillus* sp., разрушенных с помощью френч-пресса и импульсного ультразвука, на ДНК лейкоцитов крови мыши сохранялся при разведении супернатантов в 18 раз ($p < 0,01$ по множественному критерию Даннета) (рис. 5).

Таким образом, полученные результаты продемонстрировали наличие защитного эффекта экстракта реликтовых бактерий *Bacillus* sp. на ДНК лейкоцитов крови мыши при ее повреждении пероксидом водорода в нагрузочном тесте. Защитный эффект наблюдался в диапазоне кратностей разведения супернатантов лизатов бактерий от 6 до 18.

Обсуждение

Известно, что некоторые представители рода бактерий *Bacillus* (например, *B. subtilis*) являются пробиотиками. Например, в исследованиях на мышах споры *B. subtilis* оказывали иммуностимулирующий эффект при пероральном применении [19]. При применении аналогичных препаратов для кормления рыб также показано, что *B. subtilis* изменяет показатели крови и улучшает неспецифический иммунитет (non-specific immunity) [20–23]. Препараты на основе этих бактерий могут применяться в качестве замены антибиотиков при выращивании овец [24] и кур-бройлеров (broiler chickens) [25]. Другие исследователи изучали эффект иммуностимулирующих бактерий *B. licheniformis* XY-52 на рыбах grass carp [26]. С применением хроматографии и последующей перекристаллизации авторами были получены два очищенных метаболита Cyclo (Phe-Tyr) и Cyclo (Phe-Gly). При включении в диету карпов этих добавок значительно увеличились гуморальные показатели врожденного иммунитета, кроме того, заметно возросла устойчивость к инфекциям.

Из морской воды выделен новый штамм *B. subtilis* AG4, из которого экстрагирован и выделен экзополисахарид EPSR4, демонстрирующий значительную биологическую активность [27]. На различных линиях клеточных культур человека показана антиоксидантная активность этого метаболита, противоопухолевые и противовоспалительные свойства. Препарат на основе EPSR4 может в дальнейшем использоваться в качестве вспомогательной терапии при болезни Альцгеймера. Широко распространенные бактерии рода *Bacillus* могут быть источником ряда полипептидных антибиотиков, особенно ценных для использования против патогенов человека, приобретших устойчивость к обычным антибиотикам [28, 29]. Таким образом, бактерии рода *Bacillus* могут выделять ряд ценных для человека и животных метаболитов, обладающих иммуностимулирующими, антибактериальными и антиоксидантными свойствами. Ранее показана пробиотическая активность реликтовых бактерий *B. cereus*

на мышах, зараженных бактериями *Salmonella enterica* var. *enteritidis* [30]. Эти бактерии при пероральном введении защищали мышей от инфекции, вызванной сальмонеллами. Таким образом, штамм бактерий *Bacillus* sp. в дальнейшем может быть использован в качестве пробиотика.

Задачей данного исследования было изучение действия лизатов, полученных разными способами из реликтовых бактерий *Bacillus* sp., на ДНК лейкоцитов крови мыши, поврежденной пероксидом водорода. ДНК несет генетическую информацию, которая управляет сложными биологическими процессами, и поддержание стабильного генома имеет решающее значение для индивидуального роста и развития, а также для нормального развития организма. Репарация ДНК представляет собой фундаментальный и консервативный механизм, ответственный за исправление поврежденной ДНК и восстановление стабильности генома, поэтому нарушение его функционирования тесно связано с множественными заболеваниями, особенно при старении [31]. В последние годы был достигнут заметный прогресс в области исследований репарации ДНК при геронтогенезе, что позволило сформулировать некоторые закономерности, определяющие взаимосвязь между повреждением ДНК, ее репарацией, старением и заболеваниями, связанными со старением [32]. В частности, старение отрицательно влияет на эффективность систем репарации ДНК; некачественная репарация ДНК напрямую связана со старением и ассоциированными со старением болезнями; накопление повреждений ДНК, связанное с возрастом, и начало старения образуют порочный круг. В связи с этим усиление репарации ДНК может быть общим механизмом в различных стратегиях (оздоровления) омоложения [33], продления периода мезогенеза.

Ранее были показаны ДНК-протекторные свойства ряда биоактивных молекул, например витаминов С и Е, полифенолов [34], антиоксидантов [35, 36], а также веществ, содержащихся в растительных маслах [37], в частности, орегано и тимьяна, некоторых фруктах [38] и растениях [39, 40], в том числе ферментированных микроорганизмами [41]. Многие растения могут защитить клетки от окислительного стресса [42], причем около половины таких препаратов прямо или косвенно происходят из натуральных продуктов [43].

Нами продемонстрирована заметная зависимость защитного эффекта лизатов *Bacillus* sp. на ДНК лейкоцитов крови мыши при ее повреждении пероксидом водорода в нагрузочном тесте от условий предварительного инкубирования лейкоцитов в присутствии лизатов. Полученный нами протекторный эффект сравним с действием такого известного ДНК-протектора, как тимидин [44], или специфический ДНК-связанный белок, полученный из культуры *Escherichia coli* [45], или бактериальные мини-ферритины [46].

Величина обнаруженного защитного эффекта линейно зависела от длительности инкубации в течение 10–40 мин и слабо зависела от кратности разведения супернатантов лизатов, по крайней мере в диапазоне 6–18. Интересно отметить, что величина защитного эффекта лизатов, полученных разным способом, достоверно не отличалась, хотя эффективность разрушения была значительно выше при применении Френч-пресса по сравнению с разрушением ультразвуком. Это указывает на отличие в степени дезинтеграции бактерий этими способами.

Полученные результаты не дают однозначного ответа о природе действующих факторов, которые лежат в основе защитных эффектов лизатов реликтовых бактерий *Bacillus* sp. на ДНК клеток животных. Ответ на этот вопрос требует детального анализа биологически активных веществ, содержащихся в получаемых субстанциях, с помощью хромато-масс-спектрометрических и других современных методов.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора и при финансовой поддержке субсидии из областного бюджета Тюменской области (соглашение №92-ДОН от 16 августа 2022 г.).

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectoral program of Rosпотребнадзор and with the financial support of epy regional budget of the Tyumen region (Contract No 92-DON of August 16, 2022).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Благодарности

Авторы благодарны Звонареву А.Н. (ИБФМ РАН) за проведение микроскопического анализа, а также Пунтус И.Ф. (ИБФМ РАН) за выполнение дезинтеграции бактерий.

Gratitude

The authors are grateful to Zvonarev A.N. (IBPhM RAS) for microscopy analysis and to Puntus I.F. (IBPhM RAS) for disintegration of bacteria.

Литература

- Clarke TC, Black LI, Stussman BJ, Barnes PM, Nahin RL. Trends in the use of complementary health approaches among adults: United States, 2002–2012. *Nat Health Stat Report*. 2015 Feb 10;(79):1-16.
- Crovesy L, Ostrowski M, Ferreira D, Rosado E, Soares-Mota M. Effect of *Lactobacillus* on body weight and body fat in overweight subjects: a systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int J Obes*. 2017 Nov;41(11):1607-14. DOI: 10.1038/ijo.2017.161
- Suez J, Zmora N, Zilberman-Schapira G, Mor U, Dori-Bachash M, Bashirdes S, et al. Post-antibiotic gut mucosal microbiome reconstitution is impaired by probiotics and improved by autologous FMT. *Cell*. 2018 Sep 6;174(6):1406-23. e16. DOI: 10.1016/j.cell.2018.08.047
- Chouari R, Le Paslier D, Daegelen P, Ginestet P, Weissenbach J, Sghir A. Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. *Environ Microbiol*. 2005 Aug;7(8):1104-15. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2005.00795.x
- Greenblatt CL, Davis A, Clement BG, Kitts CL, Cox T, Cano RJ. Diversity of microorganisms isolated from amber. *Microb Ecol*. 1999 Jul;38(1):58-68. DOI: 10.1007/s002489900153
- Zhang DC, Brouchkov A, Griva G, Schinner F, Margesin R. Isolation and characterization of bacteria from ancient siberian permafrost sediment. *Biology (Basel)*. 2013 Jan 10;2(1):85-106. DOI: 10.3390/biology2010085
- Vreeland R, Rosenzweig W, Powers D. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature*. 2000 Oct 19;407:897-900. DOI: 10.1038/35038060
- Johnson SS, Hebsgaard MB, Christensen TR, Mastepanov M, Nielsen R, Munch K, et al. Ancient bacteria show evidence of DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 4;104(36):14401-5. DOI: 10.1073/pnas.0706787104
- Brouchkov A, Griva G, Fursova O, Fursova N, Ignatov S, Pogorelko G. Is the ancient permafrost bacteria able to keep DNA stable? *J Genet*. 2016 Dec;95(4), 1003-7. DOI: 10.1007/s12041-016-0708-0
- Brouchkov A, Melnikov V, Sukhovei Yu, Griva G, Repin V, Kalenova L, et al. Relict microorganisms of cryolithozone as possible objects of gerontology (in Russian). *Adv Gerontol*. 2011 Feb 16;1:39-44. DOI: 10.1134/S207905701101005X
- Brenner EV, Brouchkov AV, Kurilshikov AM, Griva GI, Kashuba E, Kashuba VI, et al. Draft genome sequence of *Bacillus cereus* strain F, isolated from ancient permafrost. *Genome Announc*. 2013 Aug 1;1(4):e00561-13. DOI: 10.1128/genomeA.00561-13
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New-York: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1982, p. 2230.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988 Mar;175(1):184-91. DOI: 10.1016/0014-4827(88)90265-0
- Петерсон АМ, Глинская ЕВ, Грива ГИ, Брушков АВ, Репин ВЕ, Чернявский ВФ, Софронова ОН. Бактерии, выделенные из реликтовых мерзлых толщ Центральной Якутии. *Якутский медицинский журнал*. 2011;4:70-7.
- Domanskaya OV, Bome NA, Iashnikov AV, Vasilchenko AV, Vasilchenko AS. The multiple activities and the plant beneficial potential of *Bacillus* spp. derived from the permafrost of western Siberia. *Agronomy*. 2021 Nov 11;11(13):2347. DOI: 10.3390/agronomy11112347
- Гапеев АБ, Лукьянова НА. Импульсно-модулированное электромагнитное излучение крайне высоких частот защищает ДНК клеток от повреждающего действия физико-химических факторов *in vitro*. *Биофизика*. 2015;60(5):889-97.
- Гапеев АБ, Юршенас ДА, Манохин АА, Храмов РН. Защита ДНК лейкоцитов крови от повреждающего действия ультрафиолетового излучения при использовании стратегии "Полезное Солнце". *Биофизика*. 2017;62(3):552-8. DOI: 10.1134/S0006350917030058
- Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984 Aug 30;123(1):291-8. DOI: 10.1016/0006-291x(84)90411-x
- Huang JM, La Ragione RM, Nunez A, Cutting SM. Immunostimulatory activity of *Bacillus* spores. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008 Jul;53(2):195-203. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2008.00415.x
- Kumar R, Mukherjee SC, Ranjan R, Nayak SK. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish Shellfish Immunol*. 2008 Feb;24(2):168-72. DOI: 10.1016/j.fsi.2007.10.008
- Wang GX, Liu YT, Li FY, Gao HT, Lei Y, Liu XL. Immunostimulatory activities of *Bacillus simplex* DR-834 to carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Shellfish Immunol*. 2010 Sep;29(3):378-87. DOI: 10.1016/j.fsi.2010.03.014.
- Zhou C, Wang H, Li X, Luo Y, Xie M, Wu Z, Chen X. Regulatory effect of *Bacillus subtilis* on cytokines of dendritic cells in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 17;20(2):389. DOI: 10.3390/ijms20020389
- Dias DC, Tachibana L, Iwashita MKP, Nakandakare IB, Romagosa E, Seriani R, Ranzani-Paiva MJT. Probiotic supplementation causes hematological changes and improves non-specific immunity in *Brycon amazonicus*. *Acta Sci Biol Sci*. 2020 Aug; 42:e52473. DOI: 10.4025/actasciobiolsci.v42i1.52473
- Mousa S, Elsayed A, Marghani B, Ateya A. Effects of supplementation of *Bacillus* spp. on blood metabolites, antioxidant status, and gene expression pattern of selective cytokines in growing Barki lambs. *J Adv Vet Anim Res*. 2019 Jul 13;6(3):333-40. DOI: 10.5455/javar.2019.f351

25. Mohamed TM, Sun W, Bumbie GZ, Dosoky WM, Rao Z, Hu P, Wu L, Tang Z. Effect of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* on growth performance, organ weight, digestive enzyme activities, and serum biochemical indices in broiler. *Animals*. 2022 Jun 16;12:1558. DOI: 10.3390/ani12121558
26. Chen XM, Ru HM, Niu XT, Wang GQ, Zhang DM. Enhancement of secondary metabolites from *Bacillus licheniformis* XY-52 on immune response and expression of some immune-related genes in common carp, *Cyprinus carpio*. *Fish & Shellfish Immunol*. 2015 Feb 19;45(1):124-31. DOI: 10.1016/j.fsi.2015.02.019
27. Abdel-Wahab BA, Abd El-Kareem HF, Alzamami A, Fahmy CA, Elesawy BH, Mahmoud MM, et al. Novel exopolysaccharide from marine *Bacillus subtilis* with broad potential biological activities: Insights into antioxidant, anti-inflammatory, cytotoxicity, and anti-Alzheimer activity. *Metabolites*. 2022 Jul 31;12:715. DOI: 10.3390/metabo12080715
28. Caulier S, Nannan C, Gillis A, Licciardi F, Bragard C, Mahillon J. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Front Microbiol*. 2019 Feb 26;10:302. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00302
29. Yahya G, Ebada A, Khalaf EM, Mansour B, Nouh NA, Mosbah RA, et al. Soil-associated *Bacillus* species: A reservoir of bioactive compounds with potential therapeutic activity against human pathogens. *Microorganisms*. 2021 May 24;9:1131. DOI: 10.3390/microorganisms9061131
30. Fursova O, Potapov V, Brouchkov A, Pogorelko G, Griva G, Fursova N, Ignatov S. Probiotic activity of a bacterial strain isolated from ancient permafrost against *Salmonella* infection in mice. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2012 Sep;4(3):145-53. DOI: 10.1007/s12602-012-9105-z
31. Schumacher B, Pothof J, Vijg J, Hoeijmakers JHJ. The central role of DNA damage in the ageing process. *Nature*. 2021 Apr;592(7856):695-703. DOI: 10.1038/s41586-021-03307-7
32. Niedernhofer LJ, Gurkar AU, Wang Y, Vijg J, Hoeijmakers JHJ, Robbins PD. Nuclear genomic instability and aging. *Annu Rev Biochem*. 2018 Jun 20;87:295-322. DOI: 10.1146/annurev-biochem-062917-012239
33. Chen Y, Geng A, Zhang W, Qian Z, Wan X, Jiang Y, Mao Z. Fight to the bitter end: DNA repair and aging. *Ageing Res Rev*. 2020 64:101154. DOI: 10.1016/j.arr.2020.101154
34. Alcaraz M, Armero D, Martínez-Beneyto Y, Castillo J, Benavente-García O, Fernandez H, et al. Chemical genoprotection: reducing biological damage to as low as reasonably achievable levels. *Dentomaxillofac Radiol*. 2011 Jul;40(5):310-4. DOI: 10.1259/dmfr/95408354
35. Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants and the comet assay. *Mutat Res*. 2009, Jan-Feb;681(1):51-67. DOI: 10.1016/j.mrrev.2008.05.002
36. Kotanoğlu MS, Kadioğlu E, Emerce E, Kaymak Ç, Özcan A, Başar H. Antioxidant effects of dexmedetomidine against hydrogen peroxide-induced DNA damage *in vitro* by alkaline comet assay. *Turk J Med Sci*. 2020 Aug 26;50(5):1393-98. DOI: 10.3906/sag-1910-76
37. Slamenová D, Horváthová E, Sramková M, Marsálková L. DNA-protective effects of two components of essential plant oils carvacrol and thymol on mammalian cells cultured *in vitro*. *Neoplasma*. 2007;54(2):108-12.
38. Soumya K, Haridas KR, James J, Kumar VBS, Edatt L, Sudheesh S. Study of *In vitro* antioxidant and DNA damage protection activity of a novel luteolin derivative isolated from *Terminalia chebula*. *J Taibah Univ Sci*. 2019 Jun 24;13(1):755-63. DOI: 10.1080/16583655.2019.1630892
39. Salar RK, Purewal SS. Phenolic content, antioxidant potential and DNA damage protection of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) cultivars of North Indian region. *Food Measure*. 2017;11:126-33. DOI: 10.1007/s11694-016-9379-z
40. Kaur P, Dhull SB, Sandhu KS, Salar RK, Purewal SS. Tulsi (*Ocimum tenuiflorum*) seeds: *in vitro* DNA damage protection, bioactive compounds and antioxidant potential. *Food Measure*. 2018 Mar 7;12:1530-38. DOI: 10.1007/s11694-018-9768-6
41. Salar RK, Certik M, Brezova V. Modulation of phenolic content and antioxidant activity of maize by solid state fermentation with *Thamnidium elegans* CCF 1456. *Biotechnol Bioprocess Eng*. 2012 Feb 01;17:109-16. DOI: 10.1007/s12257-011-0455-2
42. Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod Process*. 2011 Jul;89(3):217-33. DOI: 10.1016/j.fbp.2010.04.008
43. Veeresham C. Natural products derived from plants as a source of drugs. *J Adv Pharm Tech Res*. 2012 Oct;3(4):200-1. DOI: 10.4103/2231-4040.104709
44. Li Y, Guo J, Zhang H, Lam C, Luo W, Zhou H, Zhang W. Protective effect of thymidine on DNA damage induced by hydrogen peroxide in human hepatocellular cancer cells. *ACS Omega*. 2020 Aug 19;5(34):21796-804. DOI: 10.1021/ascomega.0c02843
45. Martinez A, Kolter R. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J Bacteriol*. 1997 Aug;179(16):5188-94. DOI: 10.1128/jb.179.16.5188-5194.1997
46. Arnold AR, Barton JK. DNA protection by the bacterial ferritin Dps via DNA charge transport. *J Am Chem Soc*. 2013 Oct 23;135(42):15726-29. DOI: 10.1021/ja408760w

References

1. Clarke TC, Black LI, Stussman BJ, Barnes PM, Nahin RL. Trends in the use of complementary health approaches among adults: United States, 2002–2012. *Nat Health Stat Report*. 2015 Feb 10;(79):1-16.
2. Crovesy L, Ostrowski M, Ferreira D, Rosado E, Soares-Mota M. Effect of *Lactobacillus* on body weight and body fat in overweight subjects: a systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int J Obes*. 2017 Nov;41(11):1607-14. DOI: 10.1038/ijo.2017.161
3. Suez J, Zmora N, Zilberman-Schapira G, Mor U, Dori-Bachash M, Bashardes S, et al. Post-antibiotic gut mucosal microbiome reconstitution is impaired by probiotics and improved by autologous FMT. *Cell*. 2018 Sep 6;174(6):1406-23. e16. DOI: 10.1016/j.cell.2018.08.047
4. Chouari R, Le Paslier D, Daegelen P, Ginestet P, Weissenbach J, Sghir A. Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. *Environ Microbiol*. 2005 Aug;7(8):1104-15. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2005.00795.x
5. Greenblatt CL, Davis A, Clement BG, Kitts CL, Cox T, Cano RJ. Diversity of microorganisms isolated from amber. *Microb Ecol*. 1999 Jul;38(1):58-68. DOI: 10.1007/s002489900153
6. Zhang DC, Brouchkov A, Griva G, Schinner F, Margesin R. Isolation and characterization of bacteria from ancient siberian permafrost sediment. *Biology (Basel)*. 2013 Jan 10;2(1):85-106. DOI: 10.3390/biology2010085
7. Vreeland R, Rosenzweig W, Powers D. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature*. 2000 Oct 19;407:897-900. DOI: 10.1038/35038060
8. Johnson SS, Hebsgaard MB, Christensen TR, Mastepanov M, Nielsen R, Munch K, et al. Ancient bacteria show evidence of DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 4;104(36):14401-5. DOI: 10.1073/pnas.0706787104
9. Brouchkov A, Griva G, Fursova O, Fursova N, Ignatov S, Pogorelko G. Is the ancient permafrost bacteria able to keep DNA stable? *J Genet*. 2016 Dec;95(4):1003-7. DOI: 10.1007/s12041-016-0708-0
10. Brouchkov A, Melnikov V, Sukhovei Yu, Griva G, Repin V, Kalenova L, et al. Relict microorganisms of cryolithozone as possible objects of gerontology (in Russian). *Adv Gerontol*. 2011 Feb 16;1:39-44. DOI: 10.1134/S207905701101005X
11. Brenner EV, Brouchkov AV, Kurilshikov AM, Griva GI, Kashuba E, Kashuba VI, et al. Draft genome sequence of *Bacillus cereus* strain F, isolated from ancient permafrost. *Genome Announc*. 2013 Aug 1;1(4):e00561-13. DOI: 10.1128/genomeA.00561-13
12. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New-York: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1982, p. 2230.

13. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988 Mar;175(1):184-91. DOI: 10.1016/0014-4827(88)90265-0
14. Peterson AM, Gliinskaya EV, Griva GI, Brouchkov AV, Repin VE, Chernyavskiy VF, Sofronova ON. Bacteria isolated from relict frozen terrains of the Central Yakutia. *Yakut Medical Journal*. 2011;4:70-7. (In Russian).
15. Domanskaya OV, Bome NA, Iashnikov AV, Vasilchenko AV, Vasilchenko AS. The multiple activities and the plant beneficial potential of *Bacillus* spp. derived from the permafrost of Western Siberia. *Agronomy*. 2021 Nov 11;11(13):2347. DOI: 10.3390/agronomy11112347
16. Gapeyev AB, Lukyanova NA. Pulse-modulated electromagnetic radiation of extremely high frequencies protects cellular DNA against damaging effect of physico-chemical factors *in vitro*. *Biophysics*. 2015;60(5):732-738. (In Russian).
17. Gapeyev AB, Yurshenas DA, Manokhin AA, Khramov RN. The protection of DNA in blood leukocytes from damaging action of ultraviolet radiation using the "Useful Sun" strategy. *Biophysics*. 2017 Aug 18;62(3):444-9. DOI: 10.1134/S0006350917030058 (In Russian).
18. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984 Aug 30;123(1):291-8. DOI: 10.1016/0006-291x(84)90411-x
19. Huang JM, La Razione RM, Nunez A, Cutting SM. Immunostimulatory activity of *Bacillus* spores. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008 Jul;53(2):195-203. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2008.00415.x
20. Kumar R, Mukherjee SC, Ranjan R, Nayak SK. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish Shellfish Immunol*. 2008 Feb;24(2):168-72. DOI: 10.1016/j.fsi.2007.10.008
21. Wang GX, Liu YT, Li FY, Gao HT, Lei Y, Liu XL. Immunostimulatory activities of *Bacillus simplex* DR-834 to carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Shellfish Immunol*. 2010 Sep;29(3):378-87. DOI: 10.1016/j.fsi.2010.03.014.
22. Zhou C, Wang H, Li X, Luo Y, Xie M, Wu Z, Chen X. Regulatory effect of *Bacillus subtilis* on cytokines of dendritic cells in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 17;20(2):389. DOI: 10.3390/ijms20020389
23. Dias DC, Tachibana L, Iwashita MKP, Nakandakare IB, Romagosa E, Seriani R, Ranzani-Paiva MJT. Probiotic supplementation causes hematological changes and improves non-specific immunity in *Brycon amazonicus*. *Acta Sci Biol Sci*. 2020 Aug; 42:e52473. DOI: 10.4025/actasciobiolsci.v42i1.52473
24. Mousa S, Elsayed A, Marghani B, Ateya A. Effects of supplementation of *Bacillus* spp. on blood metabolites, antioxidant status, and gene expression pattern of selective cytokines in growing Barki lambs. *J Adv Vet Anim Res*. 2019 Jul 13;6(3):333-40. DOI: 10.5455/javar.2019.f351
25. Mohamed TM, SunW, Bumbie GZ, DosokyWM, Rao Z, Hu P, Wu L, Tang Z. Effect of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* on growth performance, organ weight, digestive enzyme activities, and serum biochemical indices in broiler. *Animals*. 2022 Jun 16;12:1558. DOI: 10.3390/ani12121558
26. Chen XM, Ru HM, Niu XT, Wang GQ, Zhang DM. Enhancement of secondary metabolites from *Bacillus licheniformis* XY-52 on immune response and expression of some immune-related genes in common carp, *Cyprinus carpio*. *Fish & Shellfish Immunol*. 2015 Feb 19;45(1):124-31. DOI: 10.1016/j.fsi.2015.02.019
27. Abdel-Wahab BA, Abd El-Kareem HF, Alzamami A, Fahmy CA, Elesawy BH, Mahmoud MM, et al. Novel exopolysaccharide from marine *Bacillus subtilis* with broad potential biological activities: Insights into antioxidant, anti-inflammatory, cytotoxicity, and anti-Alzheimer activity. *Metabolites*. 2022 Jul 31;12:715. DOI: 10.3390/metabo12080715
28. Caulier S, Nannan C, Gillis A, Licciardi F, Bragard C, Mahillon J. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Front Microbiol*. 2019 Feb 26;10:302. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00302
29. Yahya G, Ebada A, Khalaf EM, Mansour B, Nouh NA, Mosbah RA, et al. Soil-associated *Bacillus* species: A reservoir of bioactive compounds with potential therapeutic activity against human pathogens. *Microorganisms*. 2021 May 24;9:1131. DOI: 10.3390/microorganisms9061131
30. Fursova O, Potapov V, Brouchkov A, Pogorelko G, Griva G, Fursova N, Ignatov S. Probiotic activity of a bacterial strain isolated from ancient permafrost against *Salmonella* infection in mice. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2012 Sep;4(3):145-53. DOI: 10.1007/s12602-012-9105-z
31. Schumacher B, Pothof J, Vijg J, Hoeijmakers JHJ. The central role of DNA damage in the ageing process. *Nature*. 2021 Apr;592(7856):695-703. DOI: 10.1038/s41586-021-03307-7
32. Niedernhofer LJ, Gurkar AU, Wang Y, Vijg J, Hoeijmakers JHJ, Robbins PD. Nuclear genomic instability and aging. *Annu Rev Biochem*. 2018 Jun 20;87:295-322. DOI: 10.1146/annurev-biochem-062917-012239
33. Chen Y, Geng A, Zhang W, Qian Z, Wan X, Jiang Y, Mao Z. Fight to the bitter end: DNA repair and aging. *Ageing Res Rev*. 2020 64:101154. DOI: 10.1016/j.arr.2020.101154
34. Alcaraz M, Armero D, Martínez-Beneyto Y, Castillo J, Benavente-García O, Fernandez H, et al. Chemical genoprotection: reducing biological damage to as low as reasonably achievable levels. *Dentomaxillofac Radiol*. 2011 Jul;40(5):310-4. DOI: 10.1259/dmfr/95408354
35. Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants and the comet assay. *Mutat Res*. 2009, Jan-Feb;681(1):51-67. DOI: 10.1016/j.mrrev.2008.05.002
36. Kotanoğlu MS, Kadioğlu E, Emerce E, Kaymak Ç, Özcan A, Başar H. Antioxidant effects of dexmedetomidine against hydrogen peroxide-induced DNA damage *in vitro* by alkaline comet assay. *Turk J Med Sci*. 2020 Aug 26;50(5):1393-98. DOI: 10.3906/sag-1910-76
37. Slamenová D, Horváthová E, Sramková M, Marsálková L. DNA-protective effects of two components of essential plant oils carvacrol and thymol on mammalian cells cultured *in vitro*. *Neoplasma*. 2007;54(2):108-12.
38. Soumya K, Haridas KR, James J, Kumar VBS, Edatt L, Sudheesh S. Study of *In vitro* antioxidant and DNA damage protection activity of a novel luteolin derivative isolated from *Terminalia chebula*. *J Taibah Univ Sci*. 2019 Jun 24;13(1):755-63. DOI: 10.1080/16583655.2019.1630892
39. Salar RK, Purewal SS. Phenolic content, antioxidant potential and DNA damage protection of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) cultivars of North Indian region. *Food Measure*. 2017;11:126-33. DOI: 10.1007/s11694-016-9379-z
40. Kaur P, Dhull SB, Sandhu KS, Salar RK, Purewal SS. Tulsī (*Ocimum tenuiflorum*) seeds: *in vitro* DNA damage protection, bioactive compounds and antioxidant potential. *Food Measure*. 2018 Mar 7;12:1530-38. DOI: 10.1007/s11694-018-9768-6
41. Salar RK, Certik M, Brezova V. Modulation of phenolic content and antioxidant activity of maize by solid state fermentation with *Thamnidium elegans* CCF 1456. *Biotechnol Bioprocess Eng*. 2012 Feb 01;17:109-16. DOI: 10.1007/s12257-011-0455-2
42. Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod Process*. 2011 Jul;89(3):217-33. DOI: 10.1016/j.fbp.2010.04.008
43. Veeresham C. Natural products derived from plants as a source of drugs. *J Adv Pharm Tech Res*. 2012 Oct;3(4):200-1. DOI: 10.4103/2231-4040.104709
44. Li Y, Guo J, Zhang H, Lam C, Luo W, Zhou H, Zhang W. Protective effect of thymidine on DNA damage induced by hydrogen peroxide in human hepatocellular cancer cells. *ACS Omega*. 2020 Aug19;5(34):21796-804. DOI: 10.1021/ascomega.0c02843
45. Martinez A, Kolter R. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J Bacteriol*. 1997 Aug;179(16):5188-94. DOI: 10.1128/jb.179.16.5188-5194.1997
46. Arnold AR, Barton JK. DNA protection by the bacterial ferritin Dps via DNA charge transport. *J Am Chem Soc*. 2013 Oct 23;135(42):15726-29. DOI: 10.1021/ja408760w

Информация о соавторах:

Аверин Михаил Вячеславович, ведущий инженер-исследователь АНО «Губернская академия»

Бородулин Максим Борисович, ведущий инженер-исследователь АНО «Губернская академия»

Гапеев Андрей Брониславович, доктор физико-математических наук, профессор Института биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Грива Геннадий Иванович, доктор геолого-минералогических наук, ведущий инженер-исследователь АНО «Губернская академия»

Захарченко Наталья Сергеевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

Мельников Владимир Павлович, доктор геолого-минералогических наук, академик РАН, главный научный сотрудник отдела методологии междисциплинарных исследований криосферы Института криосферы Земли – обособленное структурное подразделение ФГБУН ФИЦ «Тюменский научный центр» СО РАН

Потапов Василий Дмитриевич, доктор биологических наук, главный научный сотрудник отдела переподготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Рукавцова Елена Борисовна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

Храмов Роберт Николаевич, кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» РАН

Щербатюк Татьяна Григорьевна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии» Роспотребнадзора

Брушков Анатолий Викторович, доктор геолого-минералогических наук, заведующий кафедрой геоэкологии геологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова»

Information about co-authors:

Mikhail V. Averin, Leading Research Engineer, Autonomous non-profit organization «Provincial Academy»

Maxim B. Borodulin, Leading Research Engineer, Autonomous non-profit organization «Provincial Academy»

Andrey B. Gapeev, PhD, DSc (Phys.-Math.), Professor, Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences – a separate subdivision of Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences»

Gennady I. Griva. PhD, DSc (Geol.), Leading Research Engineer, Autonomous non-profit organization «Provincial Academy»

Natalya S. Zakharchenko, PhD (Biol.), Senior Researcher of the Branch of the Academicians M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS

Vladimir P. Melnikov, PhD, DSc (Geol.), Academician of the Russian Academy of Sciences, Chief Researcher of the Department of Methodology for Interdisciplinary Cryosphere Research, Institute of Earth Cryosphere Tyumen Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Vasily D. Potapov, PhD, DSc (Biol.), Chief Researcher of the Department of Retraining and Improvement of Specialists of the State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Elena B. Rukavtsova, PhD, DSc (Biol.), Senior Researcher, Branch of the Academicians M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS

Robert N. Khrarov, PhD (Phys.-Math.), Leading Researcher, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences

Tatyana G. Shcherbatyuk, PhD, DSc (Med.), Chief Researcher, Nizhny Novgorod Research Institute of Hygiene and Occupational Pathology of Rosпотребнадзора

Anatoly V. Brushkov, PhD, DSc (Geol.), Head of the Department of Geocryology, Faculty of Geology, Lomonosov Moscow State University

Эхинококкоз на юге России: эпидемиологические и эпизоотологические аспекты

Эхинококкоз человека – тяжелое паразитарное заболевание, вызываемое личиночной стадией *Echinococcus granulosus* и имеющее важное социально-экономическое значение.

Цель. Изучение и анализ современной эпидемиологической и эпизоотологической ситуации по эхинококкозу на юге России.

Материалы и методы. Проведены анализ заболеваемости эхинококкозом населения юга России и сероэпидемиологическое обследование 5404 жителей. Выполнен анализ карт эпидемиологического обследования случаев заболевания эхинококкозом на территории Карачаево-Черкесской Республики (КЧР). Изучена экстенсивность и интенсивность инвазии эхинококками собак, сельскохозяйственных и диких животных.

Результаты. Наиболее высокие показатели заболеваемости населения страны эхинококкозом регистрируются на территориях Северо-Кавказского федерального округа. Анализ карт эпидемиологического обследования в КЧР показал, что на долю взрослого населения пришлось 74,5% случаев. У 76,4% больных в частных домовладениях были сельскохозяйственные животные; 73,9% больных содержали собак, регулярная дегельминтизация которых отсутствовала. Данные анализа карт эпидемиологического обследования согласуются с результатами исследований экстенсивности и интенсивности инвазии эхинококками сельскохозяйственных животных и собак на территории КЧР. Серологическое обследование условно здорового населения показало целесообразность применения иммуноферментного анализа на эндемичных территориях для ранней диагностики эхинококкоза, а также для изучения доли населения, контактирующего с возбудителем инвазии.

Заключение. Проблема эхинококкоза на юге России остается актуальной и требует пристального внимания специалистов лечебной сети и санитарно-эпидемиологической службы в плане своевременного выявления, лечения и профилактики данного заболевания.

Твердохлебова Т.И., Ковалев Е.В., Карпущенко Г.В., Болатчиев К.Х., Думбадзе О.С., Хуторянина И.В., Черникова М.П., Димидова Л.Л., Шемякова С.А., Черниговец Л.Ф.
Инфекционные болезни. 2022; 20(2): 68–74. DOI: 10.20953/1729-9225-2022-2-68-74
Источник: <https://www.phdynasty.ru>

Получение рекомбинантных антигенов вируса SARS-CoV-2 в различных системах экспрессии

Е.А.Панферцев, Т.В.Решетняк, А.А.Горбатов, П.В.Соловьев, Т.В.Федоров,
Т.Э.Светоч, Е.В.Баранова, С.Ф.Бикетов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,
Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Целью настоящей работы являлось конструирование рекомбинантных антигенов вируса SARS-CoV-2 с использованием различных систем экспрессии для дальнейшего их применения в создании серологических тестов. В качестве исходного антигена был выбран N-белок вируса SARS-CoV-2. Для этого синтезирован *de novo* ген, кодирующий синтез нуклеокапсидного белка SARS-CoV-2 (N-белок) в клетках *Escherichia coli*. На основе этого ген-эквивалента созданы новые рекомбинантные белки, содержащие различные домены N-белка. Для клонирования фрагментов ДНК, кодирующих биологически-активные домены N-белка, и исследования их иммунобиологических свойств использовали различные системы экспрессии «вектор–хозяин». В результате работы создан набор рекомбинантных антигенов и штаммов *E. coli*, способных их продуцировать.

Ключевые слова: COVID-19, N-белок, *Escherichia coli*, аффинная хроматография, SARS-CoV-2, плазмиды

Для цитирования: Панферцев Е.А., Решетняк Т.В., Горбатов А.А., Соловьев П.В., Федоров Т.В., Светоч Т.Э., Баранова Е.В., Бикетов С.Ф. Получение рекомбинантных антигенов вируса SARS-CoV-2 в различных системах экспрессии. Бактериология. 2022; 7(4): 34–39. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-34-39

Obtaining recombinant antigens of the SARS-CoV-2 virus in various expression systems

E.A.Panfertsev, T.V.Reshetnyak, A.A.Gorbatov, P.V.Soloviev, T.V.Fedorov,
T.E.Svetoch, E.V.Baranova, S.F.Biketov

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

The aim of this work was to construct recombinant antigens of the SARS-CoV-2 virus using various expression systems for their further application in the creation of serological tests. The N-protein of the SARS-CoV-2 virus was selected as the initial antigen. For this purpose, a *de novo* gene encoding the synthesis of the nucleocapsid protein SARS-CoV-2 (N-protein) in *Escherichia coli* cells was synthesized. Based on this gene equivalent, new recombinant proteins containing various N-protein domains have been created. Various «host vector» expression systems were used to clone DNA fragments encoding biologically active N-protein domains and study their immunobiological properties.

As a result of the work, a set of recombinant antigens and *E. coli* strains capable of producing them was created.

Key words: COVID-19, N-protein, *Escherichia coli*, affinity chromatography, SARS-CoV-2, plasmids

For citation: Panfertsev E.A., Reshetnyak T.V., Gorbatov A.A., Soloviev P.V., Fedorov T.V., Svetoch T.E., Baranova E.V., Biketov S.F. Obtaining recombinant antigens of the SARS-CoV-2 virus in various expression systems. Bacteriology. 2022; 7(4): 34–39. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-34-39

Для корреспонденции:

Панферцев Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279 Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск,
Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 360-147
E-mail: panfera62@mail.ru

Статья поступила 28.11.2022 г., принята к печати 28.12.2022 г.

For correspondence:

Evgeny A. Panfertsev, MD, PhD, Senior Researcher of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov,
Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 360-147
E-mail: panfera62@mail.ru

The article was received 28.11.2022, accepted for publication 28.12.2022

Пандемия тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 является важным социально значимым событием последних лет. Одним из приоритетных направлений исследований сегодня является изучение возможностей разработки технологий использования различных макромолекул вируса для создания диагностических средств и вакцин. Совершенствование методов серологической диагностики COVID-19 и наличие для этих целей доступных средств чрезвычайно важно не только для установления этиологии инфекции, но и для корректной оценки формирования популяционного и индивидуального иммунитета, а также изучения длительности его сохранения [1].

Возбудитель заболевания COVID-19, вирус SARS-CoV-2, принадлежит к семейству сферических коронавирусов с положительной цепью РНК – *Coronaviridae*. Геном вируса кодирует четыре основных структурных белка: спайковый белок (S-белок), белок оболочки (E), мембранный белок (M) и нуклеокапсидный белок (N-белок). N-белок представляет собой щелочной белок pI (10,07) с короткой, богатой лизинном областью, состоящий из 419 аминокислотных остатков и связывающийся с РНК вирусного генома с образованием нуклеокапсида [2]. Исследования показали, что N-белок представляет собой компактный переплетенный димер, подобный аналогичным белкам коронавирусов SARS и других родственных коронавирусов [3]. N-белок достаточно консервативен, обладает сильной иммуногенностью [4], может индуцировать выработку большого количества антител в сыворотке инфицированных людей [5] и, следовательно, удобен для применения в серологических тестах. Существуют данные, что антитела к N-белку SARS-CoV-2 более чувствительны, чем антитела к спайковому белку, для обнаружения раннего заражения [6]. Экспрессия рекомбинантного N-белка, пригодного для диагностических целей, в прокариотических системах, таких как *Escherichia coli*, является экономически и практически более эффективной, в отличие от экспрессии S-белка, требующей преимущественно эукариотических систем [7–10].

Целью настоящей работы являлось конструирование рекомбинантных антигенов вируса SARS-CoV-2 с использованием различных систем экспрессии для дальнейшего их применения в создании серологических тестов.

Материалы и методы

Анализ нуклеотидной последовательности и трансляцию последовательности гена *n* в аминокислотную последовательность N-белка проводили с использованием пакета программ DNASTAR LASERGENE. Для синтеза ген-эквивалента, кодирующего N-белок, с целью последующего переклонирования в экспрессирующую векторную ДНК была использована нуклеотидная последовательность вируса SARS-CoV-2, выделенного в г. Ухань (КНР) и представленная в ресурсе NCBI (Acc.NAY572034). Синтез нуклеотидной последовательности гена *n*, кодирующего синтез полного N-белка SARS-CoV-2 размером 1287 пар оснований (п.о.), был произведен в лаборатории GENE CUST (Франция).

Для удобства последующего субклонирования синтезированный фрагмент ДНК был клонирован в составе векторной плазмидной ДНК pUC57Km.

В структуру синтезированного гена *n*, размером 1287 п.о., были включены сайты рестрикции NcoI и BamHI для переклонирования фрагмента ДНК в составе экспрессирующего вектора *pSE380* (Invitrogen, США) под контроль сильного индуцибельного Trc-промотора и полигистидиновый C-концевой домен, необходимый для иммунодетекции и аффинной хроматографической очистки белка. Данный методический подход позволил использовать синтезированный ген-эквивалент *n* размером 1287 п.о. для клонирования в нескольких экспрессирующих системах и получать гибридные белки с программируемыми иммунобиохимическими свойствами.

Для этого рекомбинантную плазмидную ДНК *pSE380* рестрицировали эндонуклеазами рестрикции NcoI+ BamHI при температуре 37°C в течение 2 ч. Рекомбинантную плазмидную ДНК *pUC57KmNC* также рестрицировали эндонуклеазами рестрикции NcoI+ BamHI при температуре 37°C в течение 2 ч. Продукты гидролиза анализировали методом электрофореза в 0,9%-м агарозном геле в присутствии EtBr. Фрагмент ДНК размером 1287 п.о. выделяли из геля при помощи набора GeneJet Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific Inc, США). Далее ДНК-фрагмент лигировали с вектором *pSE380*, рестрицированным эндонуклеазами рестрикции NcoI+ BamHI, в течение 16 ч при температуре 4°C с использованием ДНК-лигазы T4 (Thermo Fisher Scientific Inc, США). Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* DH5 α . Отбор трансформантов проводили на плотной питательной среде LA, содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Скрининг рекомбинантных плазмид, содержащих фрагменты ДНК 1287 п.о., осуществляли с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве олигонуклеотидов использовали прямой и обратный праймеры, комплементарные областям векторной плазмиды *pSE380*.

Условия реакции: режим ПЦР – 95°C / 30 с, 50°C / 30 с, 72°C / 90 с / 30 циклов. Длительность последней стадии элонгации – 4 мин. Реакция протекала в 50мМ KCl-буфере в присутствии 1,5 мМ MgCl₂, 0,2мМ dNTP и 10 пМ каждого праймера. В качестве матрицы использовали лизаты тестируемых клонов. Применяли Taq-полимеразу фирмы Thermo Fisher Scientific Inc (США). Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 1,0%-м агарозном геле в присутствии EtBr. Электрофорез в агарозном геле проводили в Трис-Борат-ЕДТА-буфере (89 мМ Трис, 89 мМ борной кислоты, 2 мМ ЕДТА, pH 10).

Из ПЦР-позитивных клонов выделяли плазмидную ДНК с помощью набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific Inc, США), которую подвергали рестрикционному картированию с последующим секвенированием клонированного гена *n* размером 1287 п.о.

В результате работы были отобраны клоны *E. coli*, содержащие рекомбинантную плазмидную ДНК *pSENC*.

Для конструирования плазмид *pETNC42* и *pETGNC55* фрагмент ДНК размером 597 п.о., кодирующий C-концевой фрагмент нуклеокапсидного белка вируса SARS-CoV-2, амплифицировали при помощи ПЦР. В качестве матричной ДНК использовали плазмиду ДНК *pSENC* и праймеры: Forward primer N 597; 5'-aac cat ggc aac tcc agg cag cag tag ggg -3'; Reverse primer N1287; 5'-aag gat ccc tag tgg tgg tgg tg-3'.

Условия реакции. Режим ПЦР: 95°C / 30 с, 55°C / 30 с, 72°C / 40 с / 30 циклов. Последняя стадия элонгации – 4 мин. Реакция протекала в 50 mM KCl-буфере в присутствии 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP и 10 pM каждого праймера. Использовали Taq-полимеразу фирмы Thermo Fisher Scientific Inc (США). Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 1,0%-м агарозном геле в присутствии EtBr. Электрофорез в агарозном геле проводили в Трис-Борат-ЕДТА-буфере (89 mM Трис, 89 mM борной кислоты, 2 mM ЕДТА, pH 10).

После очистки ДНК при помощи набора GeneJet Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific Inc, США) фрагмент был клонирован в NcoI+ BamHI сайты рестрикции плазмидных векторов pET32b и pET41b стандартным рестриктазно-лигазным методом.

Созданными плазидами *pETNC42* и *pETGNC55* трансформировали компетентные клетки *E. coli* BL21RP.

Для конструирования плазмиды *pETNC16* фрагмент ДНК размером 548 п.о., кодирующий N-концевой фрагмент нуклеокапсидного белка вируса SARS-CoV-2, был амплифицирован при помощи ПЦР. В качестве матричной ДНК использовали плазмиду ДНК *pSENC* и праймеры: Forward primer NC 548, 5'-aac cat gcc atc tga taa tgg ac-3', Reverse primer NC548, 5'-aag gat ccc tag ccg cct ctg ctc cct tct g-3'.

Условия реакции. Режим ПЦР: 95°C / 30 с, 55°C / 30 с, 72°C / 40 с / 30 циклов. Последняя стадия элонгации – 4 мин. Реакция протекала в 50mM KCl-буфере в присутствии 1,5 mM MgCl₂, 0,2mM dNTP и 10 pM каждого праймера. Использовали Taq-полимеразу фирмы Thermo Fisher Scientific Inc (США). Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 1,0%-м агарозном геле в присутствии EtBr. Электрофорез в агарозном геле проводили в Трис-Борат-ЕДТА-буфере (89 mM Трис, 89 mM борной кислоты, 2 mM ЕДТА, pH 10).

После очистки фрагмента ДНК 548 п.о. при помощи набора GeneJet Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific Inc, США) он был клонирован в NcoI+ BamHI сайты рестрикции плазмидного вектора pET32b стандартным рестриктазно-лигазным методом.

Рекомбинантными плазмидными ДНК *pSENC*, *pETNC42*, *pETNC16*, *pETGNC55* трансформировали компетентные клетки *E. coli* BL21RP.

Штаммы-продуценты белков NC46, NC42, GNC55, NC16 выращивали при температуре 37°C в жидкой аэрируемой среде LB с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) или канамицина (50 мкг/мл) в качалочных колбах до оптической плотности A600-0,6-0,8. Затем добавляли IPTG до 1 mM и растили еще 4 ч. Клеточную суспензию центрифугировали при 7000 g в течение 10 мин и температуре 4°C.

Выделение и очистку рекомбинантных белков, полученных в различных системах экспрессии и содержащих в своем составе полигистидиновый C-концевой домен, проводили при помощи аффинной хроматографии на Ni-хелатном сорбенте (NiSepfast BioToolomics, Великобритания) согласно протоколу фирмы-производителя.

Степень очистки полученных белков анализировали методом белкового электрофореза в денатурирующих условиях по методу Лэммли с окраской Кумасси.

Иммунологическую активность рекомбинантных белков, полученных в различных системах экспрессии, определяли в

иммуноблоте с сыворотками крови людей, переболевших COVID-19, и сыворотками крови условно-здоровых доноров.

Препараты рекомбинантных белков после белкового электрофореза в денатурирующих условиях по методу Лэммли в 12%-м полиакриламидном геле переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Millipore, США) в течение 1 ч в 0,025 M трис-HCl буферном растворе, содержащем 0,192 M глицина (pH 8,3) и 20% этанола. Места неспецифического связывания насыщали 5%-м раствором сухого обезжиренного молока при 37°C в течение 1 ч в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) pH 7,4 («ЭКО-СЕРВИС», Россия). Затем мембрану, содержащую рекомбинантные белки, инкубировали с сыворотками крови от людей, переболевших COVID-19, и сыворотками крови условно-здоровых доноров 1 ч при 37°C в ФСБ (ФСБ-Т) с добавлением 0,05% Твин-20. После отмывки в ФСБ-Т мембраны обрабатывали антивидовыми антителами, меченными пероксидазой хрена (AntiHumanIgG-HRP Sigma, США), в течение 1 ч при 37°C. Затем мембраны промывали в ФСБ-Т и проявляли в растворе хромагена (1 мг/мл 3,3-диаминобензидин-тетрагидрохлорида в 50 mM трис-HCl буферном растворе (pH 7,4)). Реакцию останавливали отмыванием мембран в дистиллированной воде.

Результаты и обсуждение

В результате проведенной работы на основе синтетического гена *n* были созданы штаммы *E. coli* – продуценты различных вариантов рекомбинантного N-белка вируса SARS-CoV-2.

Всего было получено четыре варианта рекомбинантного N-белка вируса SARS-CoV-2 с условными наименованиями: NC46, NC42, GNC55, NC16.

Белок NC46 с молекулярной массой 46 кДа представляет собой полный нуклеокапсидный белок, содержащий полный набор антигенных доменов N-белка вируса SARS-CoV-2. Физическая карта плазмиды *pSENC* представлена на рис. 1а.

Белок NC42 с молекулярной массой 42 кДа представляет собой C-концевой фрагмент нуклеокапсидного белка, в котором N-концевой РНК-связывающий домен, присутствующий в структуре нативного N-белка и родственных ему коронавирусов, заменен на ген *trx*, кодирующий синтез белка тиреодоксина, увеличивающего выход целевого белка. Физическая карта плазмиды *pETNC42* представлена на рис. 1б.

Белок GNC55 с молекулярной массой 55 кДа представляет собой C-концевой фрагмент нуклеокапсидного белка, в котором N-концевой РНК-связывающий домен, присутствующий в структуре нативного N-белка и родственных ему коронавирусов, заменен на ген *gst*, кодирующий синтез белка глутатион-трансферазы, увеличивающего выход целевого белка. Физическая карта плазмиды *pETNC16* представлена на рис. 1г.

Белок NC16 с молекулярной массой 40 кДа представляет собой N-концевой РНК-связывающий домен, слитый с белком тиреодоксином. Физическая карта плазмиды *pETNC16* представлена на рис. 1в.

Использованные при конструировании новых плазмидных ДНК векторные системы с сильными промоторами T7 и Trc

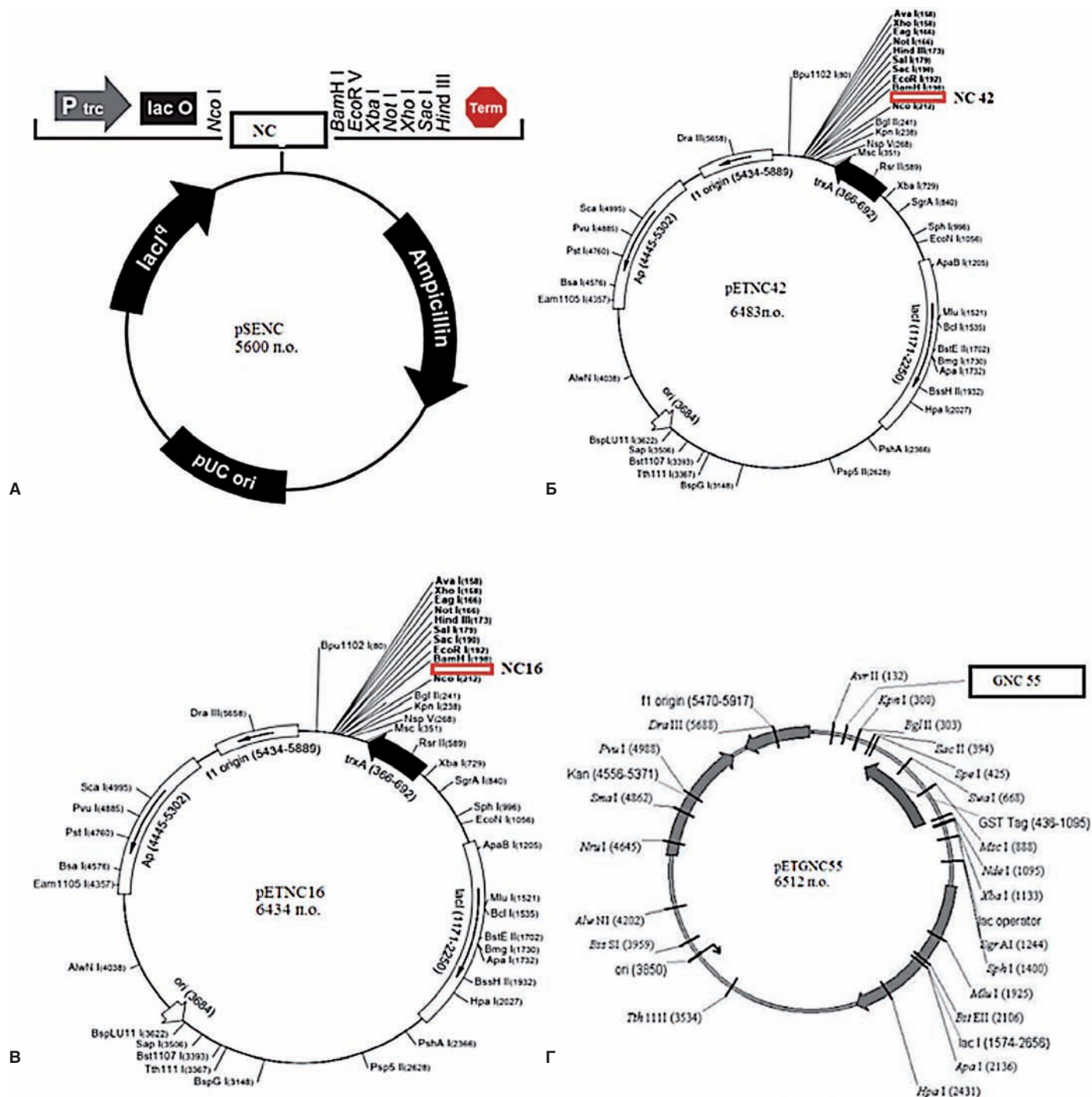


Рис. 1. Физическая карта плазмид: а – *pSENC*, б – *pETNC42*, в – *pETNC16*, г – *pETGNC55*.

позволили осуществить высокоэффективную контролируруемую экспрессию целевых белков, достаточную для наработки необходимого количества антигенных препаратов с заданными свойствами.

Рекомбинантные белки NC46, NC42, GNC55, NC16 после культивирования, выделения и очистки имели в своем составе домены для иммунодетекции и аффинной хроматографической очистки.

Степень чистоты полученных препаратов после составила не менее 98% для каждого (рис. 2А).

При применении различных высокоэффективных систем «вектор–хозяин» при наработке рекомбинантных N-белков установлен различный выход целевого продукта из биомас-

сы. Так, при использовании гена *trxA*, кодирующего синтез белка тиреодоксина, при получении NC42 выход в зависимости от эксперимента выше в 2–2,5 раза, чем при наработке NC46, GNC55, NC16 (таблица).

Антигенные свойства полученных рекомбинантных белков NC46, NC42, GNC55, NC16, подтвержденные в иммуноблоттинге с сыворотками крови от людей, переболевших COVID-19, и сыворотками крови условно-здоровых доноров (рис. 2Б), позволили судить о высокой специфической активности полученных препаратов. Молекулярная масса выявленных в иммуноблоттинге антигенов совпадает с теоретической молекулярной массой и данными электрофореза (рис. 2А).

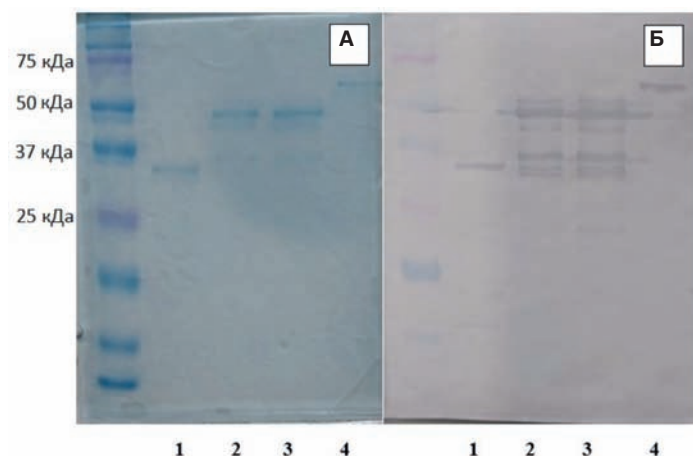


Рис. 2. А – электрофорез препаратов рекомбинантных белков (1 – NC16; 2 – NC42; 3 – NC46; 4 – GNC55); Б – иммуноблоттинг препаратов рекомбинантных белков (1 – NC16; 2 – NC42; 3 – NC46; 4 – GNC55) с сыворотками крови от людей, переболевших COVID-19.

Наименование белка	Выход белка из 1 г биомассы, мг
NC46	3–6
NC42	12–15
GNC55	5–7
NC16	3–5

Заключение

Разработаны прокариотические векторные системы экспрессии рекомбинантных антигенов SARS-CoV-2 в клетках *E. coli*, к достоинствам которых можно отнести высокий выход целевого продукта и простоту его выделения.

Экспериментально обоснована возможность применения полученных рекомбинантных антигенов SARS-CoV-2 для детекции антител к вирусу SARS-CoV-2 и использование их при конструировании диагностических серологических тестов (в форматах иммуноферментного анализа и иммунохроматографии), а также при отборе и анализе различных биоматериалов (гипериммунных сывороток, моноклональных антител) с целью решения исследовательских и прикладных задач.

Информация о финансировании

Работа выполнена по НИОКР 1.1.17 в рамках государственного задания.

Financial support

The work was carried out within the framework of R&D 1.1.17 within the framework of the state assignment.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Abduljalil JM. Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2: available approaches and limitations. *New Microbes New Infect.* 2020 Jun 14;36:100713. DOI: 10.1016/j.nmni.2020.100713
2. Marra MA, Jones SJ, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, Butterfield YS, et al. The Genome Sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science.* 2003 May 30;300(5624):1377-8. DOI: 10.1126/science.1086418.
3. Харченко ЕП. Коронавирус SARS-CoV-2: особенности структурных белков, контагиозность и возможные иммунные коллизии. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2020;19(2):13-30. DOI: 10.31631/2073-3046-2020-19-2-13-30
4. Timani KA, Ye L, Ye L, Zhu Y, Wu Z, Gong Z. Cloning, sequencing, expression, and purification of SARS-associated coronavirus nucleocapsid protein for serodiagnosis of SARS. *J Clin Virol.* 2004 Aug;30(4):309-12. DOI: 10.1016/j.jcv.2004.01.001
5. Burbelo PD, Riedo FX, Morishima C, Rawlings S, Smith D, Das S, et al. Detection of Nucleocapsid Antibody to SARS-CoV-2 is More Sensitive than Antibody to Spike Protein in COVID-19 Patients. *medRxiv [Preprint].* 2020 Apr 24:2020.04.20.20071423. DOI: 10.1101/2020.04.20.20071423
6. Burbelo PD, Riedo FX, Morishima C, Rawlings S, Smith D, Das S, et al. Sensitivity in Detection of Antibodies to Nucleocapsid and Spike Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Patients With Coronavirus Disease 2019. *J Infect Dis.* 2020 Jun 29;222(2):206-213. DOI: 10.1093/infdis/jiaa273
7. Maache M, Komurian-Pradel F, Rajoharison A, Perret M, Berland JL, Pouzol S, et al. Falsepositive results in a recombinant severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid-based western blot assay were rectified by the use of two subunits (S1 and S2) of spike for detection of antibody to SARS-CoV. *Clin Vaccine Immunol.* 2006 Mar;13(3):409-14. DOI: 10.1128/CVI.13.3.409-414.2006
8. Pei H, Liu J, Cheng Y, Sun C, Wang C, Lu Y, et al. Expression of SARS-coronavirus nucleocapsid protein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis* for serodiagnosis and mucosal vaccination. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005 Aug;68(2):220-7. DOI: 10.1007/s00253-004-1869-y
9. Wu XD, Shang B, Yang RF, Yu H, Ma ZH, Shen X, et al. The spike protein of severe acute respiratory syndrome (SARS) is cleaved in virus infected Vero-E6 cells. *Cell Res.* 2004 Oct;14(5):400-6. DOI: 10.1038/sj.cr.7290240
10. Zeng W, Liu G, Ma H, Zhao D, Yang Y, Liu M, et al. Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Jun 30;527(3):618-623. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.04.136

References

1. Abduljalil JM. Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2: available approaches and limitations. *New Microbes New Infect.* 2020 Jun 14;36:100713. DOI: 10.1016/j.nmni.2020.100713
2. Marra MA, Jones SJ, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, Butterfield YS, et al. The Genome Sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science.* 2003 May 30;300(5624):1377-8. DOI: 10.1126/science.1086418.
3. Kharchenko EP. The coronavirus SARS-CoV-2: the characteristics of structural proteins, contagiousness, and possible immune collisions. *Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2020;19(2):13-30. DOI: 10.31631/2073-3046-2020-19-2-13-30 (In Russian).
4. Timani KA, Ye L, Ye L, Zhu Y, Wu Z, Gong Z. Cloning, sequencing, expression, and purification of SARS-associated coronavirus nucleocapsid protein for serodiagnosis of SARS. *J Clin Virol.* 2004 Aug;30(4):309-12. DOI: 10.1016/j.jcv.2004.01.001
5. Burbelo PD, Riedo FX, Morishima C, Rawlings S, Smith D, Das S, et al. Detection of Nucleocapsid Antibody to SARS-CoV-2 is More Sensitive than Antibody to

- Spike Protein in COVID-19 Patients. medRxiv [Preprint]. 2020 Apr 24:2020.04.20.20071423. DOI: 10.1101/2020.04.20.20071423
6. Burbelo PD, Riedo FX, Morishima C, Rawlings S, Smith D, Das S, et al. Sensitivity in Detection of Antibodies to Nucleocapsid and Spike Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Patients With Coronavirus Disease 2019. *J Infect Dis.* 2020 Jun 29;222(2):206-213. DOI: 10.1093/infdis/jiaa273
 7. Maache M, Komurian-Pradel F, Rajoharison A, Perret M, Berland JL, Pouzol S, et al. Falsepositive results in a recombinant severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid-based western blot assay were rectified by the use of two subunits (S1 and S2) of spike for detection of antibody to SARS-CoV. *Clin Vaccine Immunol.* 2006 Mar;13(3):409-14. DOI: 10.1128/CVI.13.3.409-414.2006
 8. Pei H, Liu J, Cheng Y, Sun C, Wang C, Lu Y, et al. Expression of SARS-coronavirus nucleocapsid protein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis* for serodiagnosis and mucosal vaccination. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005 Aug;68(2):220-7. DOI: 10.1007/s00253-004-1869-y
 9. Wu XD, Shang B, Yang RF, Yu H, Ma ZH, Shen X, et al. The spike protein of severe acute respiratory syndrome (SARS) is cleaved in virus infected Vero-E6 cells. *Cell Res.* 2004 Oct;14(5):400-6. DOI: 10.1038/sj.cr.7290240
 10. Zeng W, Liu G, Ma H, Zhao D, Yang Y, Liu M, et al. Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Jun 30;527(3):618-623. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.04.136

Информация о соавторах:

Решетняк Татьяна Викторовна, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Горбатов Алексей Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Соловьев Павел Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Федоров Тарас Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Светоч Татьяна Эдуардовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Баранова Евгения Владимировна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Бикетов Сергей Фёдорович, кандидат биологических наук, главный научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Tatyana V. Reshetnyak, Researcher of Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Aleksey A. Gorbatov, MD, PhD, Senior Researcher of Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Pavel V. Soloviev, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher, of Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Taras V. Fedorov, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher, of Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Tatyana E. Svetoch, PhD (Biological Sciences), Researcher, Laboratory for Plague, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Evgenia V. Baranova, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher of Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Sergey F. Biketov, PhD (Biological Science), Leading Researcher of Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Контаминация яйцами гельминтов сточных вод и их осадков на изучаемых территориях ХМАО–Югры

Важными и эколого-эпидемиологически значимыми объектами являются очистные сооружения, которые оценивают по результатам исследований на паразитологические показатели сточных вод и их осадков.

Цель. Провести санитарно-паразитологические исследования сточных вод и их осадков на трех территориях округа. Установить закономерность распространения и распределения возбудителей паразитозов в окружающей среде. Материалы и методы. Исследования проводили в паразитологической лаборатории ФФБУЗ «ЦГиЭ в ХМАО–Югре» в г. Нижневартовске и Нижневартовском районе, г. Мегионе и г. Радужном, а также в лабораториях центров гигиены и эпидемиологии на территориях Белоярского и Кондинского районов. Санитарно-паразитологическими методами исследованы 1084 пробы сточных вод и их осадков с канализационных очистных сооружений в соответствии с МУК 4.2.2661-10 «Методы санитарно-паразитологических исследований». Жизнеспособность выявленных яиц гельминтов определяли методом термостатирования.

Результаты. Санитарно-паразитологическое обследование сточных вод до очистки показало, что среди выявленных яиц геогельминтов преобладает *Ascaris* spp., что свидетельствует о передвижении яиц с ливневыми поверхностными стоками.

Москина О.В., Малышева Н.С., Касаткина М.В., Шафранова Л.Н.,
Козлова И.И., Максимова М.С., Степанова Е.В., Морозов Е.Н.
Инфекционные болезни. 2022; 20(2): 63–67. DOI: 10.20953/1729-9225-2022-2-63-67
Источник: <https://www.phdynasty.ru>

Частота обнаружения грибов рода *Candida* при хроническом тонзиллите у детей

Г.М.Одилова

Самаркандский медицинский университет, Самарканд, Республика Узбекистан

Заболевания верхних дыхательных путей часто сопровождаются обнаружением микроскопических грибов рода *Candida*, значение которых недостаточно оценено. Грибы могут не только вызывать кандидоз, но и, участвуя в микробных ассоциациях, влиять на течение болезней, возбудителями которых являются бактерии. Данное исследование было проведено с целью обнаружения грибов рода *Candida* при хроническом тонзиллите у детей. Выделенные штаммы грибов изучали до вида по наличию морфологических признаков, типу филаментации, способности образовывать хламидоспоры, биохимическим свойствам и ассимиляции сахаров. Всего были обследованы 133 ребенка в возрасте 2–14 лет (68 мальчиков и 65 девочек).

Ключевые слова: *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Candida*, хронический тонзиллит, стафилококк, дети, ревматизм

Для цитирования: Одилова Г.М. Частота обнаружения грибов рода *Candida* при хроническом тонзиллите у детей. Бактериология. 2022; 7(4): 40–43. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-40-43

The frequency of detection of *Candida* fungi in chronic tonsillitis in children

G.M.Odilova

Samarkand Medical University, Samarkand, Uzbekistan

Diseases of the upper respiratory tract are often accompanied by the detection of microscopic fungi of the genus *Candida*, the significance of which is not sufficiently appreciated. Fungi can not only cause candidiasis, but affect the course of diseases caused by bacteria by participating in microbial associations. This study was conducted to detect fungi of the genus *Candida* in chronic tonsillitis in children. The isolated strains of fungi have been studied to species by the presence of morphological features, type of filamentation, ability to form chlamydo spores, biochemical properties and assimilation of sugars. A total of 133 children aged 2–14 years were examined, including 68 boys and 65 girls.

Key words: *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Candida*, chronic tonsillitis, staphylococcus, children, rheumatism

For citation: Odilova G.M. The frequency of detection of *Candida* fungi in chronic tonsillitis in children. Bacteriology. 2022; 7(4): 40–43. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-40-43

В последние годы значительно возросла роль заболеваний грибковой инфекции в патологии человеческого организма [1]. Это часто связано с нарушением личной гигиены, нерациональным применением антибиотиков и ухудшением местного и общего иммунитета [2]. Грибковая инфекция также случается при воспалительных заболеваниях ротовой полости, гингивите, периодонтите [3].

При всех перечисленных заболеваниях могут обнаруживаться микроскопические грибы рода *Candida*, значение которых недостаточно оценивается врачами [1, 2]. Эти грибы могут не только вызывать кандидоз, но и, участвуя в микробных ассоциациях, влиять на течение болезней. В связи с этим число больных оральным кандидозом значительно увеличивается [4].

Дрожжеподобные грибы рода *Candida* обнаруживаются при хроническом тонзиллите на слизистой миндалин у

взрослых лиц значительно чаще, чем у здоровых [5]. У детей среди болезней верхних дыхательных путей больший процент принадлежит хроническому тонзиллиту, возбудителями которого чаще всего являются патогенные стафилококки и стрептококки, а также ассоциации этих бактерий с грибами рода *Candida* [6].

Грибы рода *Candida* представляют собой часть биоценоза организма, они взаимодействуют с условно-патогенными микроорганизмами и с представителями нормальной микрофлоры человека [7]. Наиболее изучено влияние этих грибов на патологические состояния, при которых возбудитель находится на слизистой зева, в непосредственной близости от главного места обитания грибов *Candida* в организме человека – слизистой ротовой полости [8].

Удалось расшифровать некоторые стороны механизма этого влияния и, в частности, установить, что в присутствии

Для корреспонденции:

Одилова Гулноза Махсудовна, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Самаркандского медицинского университета

Адрес: 140100, Самарканд, ул. Амира Темура, 18

Телефон: +998 (66) 233-7175

E-mail: Gulnoza_5999@mail.ru

Статья поступила 28.09.2022 г., принята к печати 28.12.2022 г.

For correspondence:

Gulnoza M. Odilova, Assistant of the Department Microbiology, Virology and Immunology, Samarkand Medical University

Address: 18 Amir Temur str., Samarkand, 140100, Republic of Uzbekistan

Phone: +998 (66) 233-7175

E-mail: Gulnoza_5999@mail.ru

The article was received 28.09.2022, accepted for publication 28.12.2022

грибов *Candida* снижается чувствительность бактерий-возбудителей к антибиотикам, а также иногда усиливается вирулентность бактерий [3]. Практическое значение этих данных еще более усиливается, если учесть, что грибы рода *Candida* обнаруживаются в последние годы в зеве больных хроническим тонзиллитом и у бактерионосителей [9]. Поэтому необходимо еще раз подчеркнуть, что при всех заболеваниях верхних дыхательных путей бактериальной природы рационально исследовать слизистую ротовой полости и зева на присутствие грибов рода *Candida* и в случае их обнаружения назначать противогрибковую терапию [10].

Источником инфекции кандидоза является не только собственная микрофлора организма, но также окружающая среда. Грибы, вызывающие патологии, своих свойств могут не менять, но организм хозяина может изменять свои свойства – снижается иммунитет [2].

Патогенные грибы, прикрепляясь к поверхностям и проникая глубже к клеткам эпителия, вызывают патологический процесс [11]. Если лечить кандидоз своевременно, то он не причиняет особого вреда здоровью человека [1]. Однако симптомы заболевания могут проявляться у пациентов в виде неприятных ощущений, и оно, в частности, может привести к повреждению репродуктивных органов и мочевыделительной системы [5].

Установлено, что грибы рода *Candida* выделяются от больных в остром периоде заболевания (около 25% случаев) и от носителей бактериальной инфекции (20% случаев) [10]. Показано также, что экспериментальная инфекция, вызванная заболеванием верхних дыхательных путей в ассоциации с грибом *Candida albicans*, протекает значительно тяжелее, чем соответствующие моноинфекции [9].

Исследования инфекций, вызванных метициллин-резистентными стафилококками, выявили наличие сопутствующей грибной микрофлоры. [12]. В доступной литературе отсутствуют данные о ферментативных мутантах грибов *Candida*, как спонтанных, так и индуцированных [3]. В то же время имеется большое количество данных о том, что в ассоциациях с грибами *Candida* резко понижается чувствительность патогенных бактерий к антибиотикам. Наличие генетически маркированных штаммов грибов позволит изучить это явление на генетическом уровне [7].

В предыдущих работах по сравнительному исследованию чувствительности местных штаммов грибов *Candida* к противогрибковым препаратам нами были получены данные, что наиболее эффективными из них были леворин и декамин, также наблюдалась повышенная чувствительность к нистатину [12]. Эти данные следует учитывать при назначении противогрибковой терапии [3].

Цель исследования – выяснения частоты обнаружения различных видов грибов рода *Candida* при хроническом тонзиллите у детей.

Материал и методы

Всего были обследованы 133 ребенка в возрасте 2–14 лет (68 мальчиков и 65 девочек). Материал из зева забирали стандартным ватным тампоном, посев производили на среду Сабуро со стрептомицином с целью подсчета колоний грибов и выделения чистой культуры. При идентификации

определяли род и вид гриба. Выделенные штаммы грибов изучали до вида по наличию морфологических признаков, типу филаментации, способности образовывать хламидоспоры, биохимическим свойствам и ассимиляции сахаров. Для определения чувствительности грибов к антимикотикам использовали тест-систему Fungi_test (BioRad, США).

Из выделенного от больных материала делали высевы на серию питательных сред для обнаружения стрептококковой инфекции. Для определения чувствительности выделенной сопутствующей микрофлоры к антибиотикам использовали диско-диффузионный метод. Выделенные культуры стрептококков подвергались детальному изучению.

Результаты и обсуждение

Обследуемые дети находились на лечении в детском отделении клиники Самаркандского государственного медицинского университета. Всем больным на основании осмотра и заключения отоларинголога был поставлен диагноз «хронический тонзиллит». У большинства больных это заболевание сочеталось с другими (болезни желчевыводящей системы, ревматизм, пневмония и др.).

Из зева больных было выделено 60 штаммов дрожжеподобных грибов, что составило 45,1%. Наиболее часто выделяли вид *C. albicans* (51 штамм, 85%). Из других видов были обнаружены *C. pseudotropicalis* (6), *C. tropicalis* (2) и *C. krusei* (1). Часть детей (38 человек) была обследована повторно, и у 17 из них были вновь выделены грибы того же вида. У 18 детей выявили значительную обсемененность миндалин грибами (100–1000 колоний при посеве стандартного тампона на чашку со средой), у 11 высевали единичные колонии, в 25 случаях одновременно с грибами были выделены патогенные стафилококки и стрептококки.

Помимо больных хроническим тонзиллитом были обследованы 30 детей, находящиеся на лечении в тех же больницах по поводу ревматизма, хронического холецистита, гастрита и заболеваний нервной системы, но не страдающие хроническим тонзиллитом. Дрожжеподобные грибы были обнаружены в этой группе только у 3 детей, причем в небольшом количестве.

Методом сравнения разности показателей с величиной максимального теоретически ожидаемого отклонения полученные данные частоты обнаружения грибов у детей были сопоставлены с частотой выделения их у взрослых (42,08%). В результате было выявлено, что грибы рода *Candida* у детей и взрослых обнаруживаются при хроническом тонзиллите с одинаковой частотой ($d = 3,11\%$; $14,11\%$; $p < 0,01$).

При исследовании резистентности выделенных грибов к антибиотикам оказалось, что 87% штаммов *C. albicans* и *C. krusei* были чувствительны к леварину. Все штаммы *C. albicans* и *C. krusei* были чувствительны к вориконазолу.

80% штаммов *C. albicans* и 58% штаммов *C. krusei* сохраняли чувствительность к флуконазолу.

Все штаммы *C. valida* были чувствительны к флуконазолу и вориконазолу.

Все выделенные штаммы *C. parapsilosis* были чувствительны к флуконазолу; 62% штаммов оказались чувствительны к вориконазолу. Все штаммы грибов были устойчивы к нистатину.

Эффективность лечения флуконазолом составила 85%, вориконазолом – 90%, леварином – 50%. В ходе лечения пациентов использовали также комбинации антибиотиков с препаратом вориконазол.

Результаты микробиологических исследований показали, что у 64 (48,2%) больных были выделены возбудители в монокультуре, у 46 (35%) были обнаружены микробные ассоциации, а высеив образцов от 23 (16,8%) больных на аэробную и анаэробную микрофлору дал отрицательные результаты при использовании набора избранных нами питательных сред.

Анализ микробных ассоциаций при исследовании больных показал, что в их составе обычно были представители условно-патогенной микрофлоры. У 49 больных из 133 выделяли *Streptococcus pyogenes*, при этом у 31 больного – в монокультуре и у 25 – в ассоциациях. У 28 (18,5%) больных были найдены *Staphylococcus aureus*, причем микробы этого вида с одинаковой частотой выделялись в монокультуре и в сочетании с другими видами. В ассоциациях с *S. pyogenes* и *St. aureus* чаще всего обнаруживали кишечную палочку, энтерококки, а также одновременно грибы рода *Candida*. В исследуемом материале от 41 больного были найдены *S. pyogenes*, причем у 37 – в чистой культуре. Энтерококки обнаружены у 43 больных, из них у 28 – в монокультуре. Зеленыя стрептококки были выделены от больных в чистой культуре, а дрожжеподобные грибы – только в ассоциациях.

Как правило, воспалительные процессы, при которых были выявлены микробные ассоциации, носили затяжной и более тяжелый характер. Сравнительный анализ, сопоставление клинических форм заболевания с находками определенных микроорганизмов не выявили какой-либо закономерности. Для изучения биологических свойств обоих видов кокков, выделенных от больных детей, исследовали лейкоцитарную, ДНКазную, гемолитическую, лизоцимную активности, способность аэробно и анаэробно разлагать маннит, анаэробно ферментировать глюкозу и образовывать пигмент, чувствительность к антибиотикам.

Результаты изучения 38 культур, которые были отнесены к *S. pyogenes*, показали, что 35 штаммов обладали коагулазной, лецитовителлазной и гемолитической активностью. Продуцировали 32 штамма, 28 оказались лизоцим-положительными и 31 штамм образовывал зеленоватый пигмент. К этому виду стрептококков были отнесены и 3 каталаза-отрицательных варианта, которые давали положительную ДНКазную, гемолитическую, лейкоцитарную реакции, аэробно и анаэробно сбраживали сахара и обладали другими признаками патогенности.

К виду *St. aureus* были отнесены 50 штаммов стафилококков, которые не коагулировали плазму, не ферментировали аэробно и анаэробно маннит, разлагали глюкозу. При изучении других признаков оказалось, что из 50 культур *St. aureus* 18 штаммов образовывали пигмент, 9 продуцировали лизоцим, 8 – лецитовителлазу, 4 – гемолизин и 3 – ДНКазу. Исследование показало, что только единичные культуры обладали отдельными маркерами патогенности, однако даже при такой минимальной «вооруженности» стафилококки являлись возбудителями нагноительных процессов, так как выделялись в большом количестве и в монокультуре.

Все стрептококковые культуры были испытаны методом стандартных дисков на устойчивость к 5 антибиотикам – цефазолину, неомицину, клиндамицину, цефуроксиму, цефпирону и цефатаксиму. При исследовании антибиотикограмм *S. pyogenes* оказалось, что 17 культур были чувствительными ко всем препаратам. Из 21 устойчивого штамма 20 были резистентны к цефазолину, 9 – к неомицину, 8 – к клиндамицину, по 14 штаммов – к цефазолину и цефатаксиму, 2 – к цефпирону. 12 культур оказались устойчивыми к одному антибиотику, 3 штамма – к 2, 3 – к 3 препаратам и только 2 штамма оказались устойчивыми ко всем изученным препаратам. Из 50 культур *S. pyogenes* 13 были резистентны ко всем изученным препаратам, 26 оказались высокочувствительными ко всем антибиотикам. Антибиотикограммы остальных 11 культур были пестрыми, и среди них тождественных штаммов не наблюдалось.

Заключение

В цели наших исследований не входило выявление и детальное изучение стрептококков. Но мы сравнили свойства стрептококков в ассоциациях с грибами. Дрожжеподобные грибы встречаются в зеве детей при хроническом тонзиллите чаще, чем при других заболеваниях (45,1% случаев). У детей наиболее часто выделяется вид *C. albicans* (85%).

При хроническом тонзиллите необходимо обследовать больных на наличие грибов рода *Candida*, а при их обнаружении назначать антифунгицидные препараты с антибиотиками.

Информация о финансировании

Бюджетное финансирование.

Financial support

Budget financing.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Author declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Енин ИП, Батулин ВА, Щетинин ЕВ, Карпов ВП, Енин ИВ. Микрофлора небных миндалин при хроническом тонзиллите. Вестник оториноларингологии. 2013;78(4):21-22.
2. Бондаренко АП, Троценко ОЕ, Зайкина ОН, Корита ТВ. Участие грибов рода *Candida* в фарингеальной патологии у взрослых и часто болеющих детей. Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2015;58:53-58.
3. Шайкулов ХШ, Одилова ГМ. Чувствительность к антимикотикам дрожжеподобных грибов рода *Candida*, выделенных из влагалища у беременных женщин в амбулаторных условиях. Сборник трудов XVIII Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежь и медицинская наука в XXI веке». Под ред. Шешунова ИВ, Мазиной НК, Кислицына ЮВ. Киров, 2017, с. 169-170.
4. Крюков АИ, Ивойлов АЮ, Кунельская ВЯ, Шадрин ГБ, Мачулин АИ. Экспериментальное обоснование применения новых методик при терапии грибковых аденоидитов у детей. Вестник оториноларингологии. 2014;4:43-51.

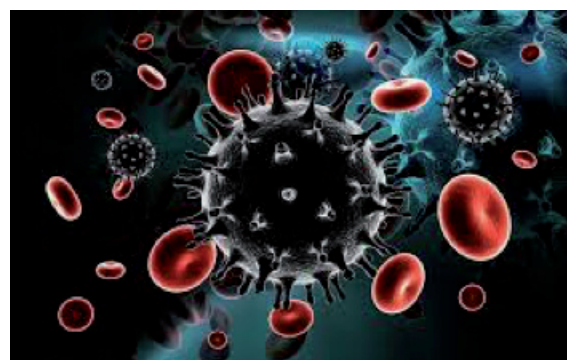
5. Цыркунова ВМ, Васильева ВС, Астапова АА. Детские инфекционные болезни. Лечебная практика: учеб. пособие. Минск: АСАР; 2013, 512 с.
6. Крюков АИ, Кунельская ВЯ, Ивойлов АЮ, Изотова ГН, Шадрин ГБ, Мачулин АИ. Грибковый аденоидит и тонзилломикоз у детей: особенности диагностики и терапии. Вестник оториноларингологии. 2019;84(2):78-83. DOI: 10.17116/otorino20198402178
7. Фейгин ГА, Мактыбаева ДА, Шевчук ВГ, Насыров МВ. О классификации хронического тонзиллита. Вестник Кыргызско-Российского Славянского университета. 2019;19(5):89-93.
8. Салтанова ЖЕ. Хронический тонзиллит и его бактериальные возбудители. Кремлевская медицина. Клинический вестник. 2013;2:206-12.
9. Левинсон У. Медицинская микробиология и иммунология. 2-е изд. М.: Лаборатория знаний; 2020.
10. Кренделев МС. К вопросу об этиологии тонзиллита. Современные проблемы науки и образования. 2015;4. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=21081>
11. Одилова ГМ, Шайкулов ХШ, Юсупов МИ Клинико-бактериологическая характеристика стафилококковых диарей у детей грудного возраста. Вестник врача. 2020;4(97):70-3.
12. Присакарь ВИ, Буга ДВ, Сава ВИ. Внутрибольничные инфекции, вызванные метициллинрезистентными стафилакокками (mrs). Клиническая медицина. 2018;12.
3. Shaikulov KhSh, Odilova GM. Sensitivity to antimycotics of yeast-like fungi of the genus *Candida* isolated from the vagina in pregnant women on an outpatient basis. Proceedings of the XVIII All-Russian Scientific Conference of students and young scientists with international participation "Youth and medical science in the XXI century". Edited by Sheshunov IV, Mazina NK, Kisiitsyn YuV. Kirov, 2017, pp. 169-170. (In Russian).
4. Krukov AI, Ivoilov Alu, Kunelskaia Vla, Shadrin GB, Machulin AI. The experimentally-based rationale for the application of the new methods designed to treat fungal adenoiditis in the children. Vestnik otorinolaringologii. 2014;4:43-51. (In Russian).
5. Tsyrkunova VM, Vasilyeva VS, Astapova AA. Children's infectious diseases. Medical practice. Minsk, 2013, 512 p. (In Russian).
6. Krukov AI, Kunelskaia Vla, Ivoilov Alu, Izotova GN, Shadrin GB, Machulin AI. Fungal adenoiditis and tonsillomycosis in children: features of diagnosis and therapy. Vestnik otorinolaringologii. 2019;84(2):78-83. DOI: 10.17116/otorino20198402178 (In Russian).
7. Feigin GA, Maktybaeva DA, Shevchuk VG, Nasyrov MV. On the classification of chronic tonsillitis (in order of discussion). Vestnik KRSU. 2019;19(5):89-93. (In Russian).
8. Saltanova JE. Chronic tonsillitis and its bacterial pathogens. Kremlin Medicine Journal 2013;2:206-12. (In Russian).
9. Levinson W. Review of medical microbiology and immunology. 2nd ed. Moscow, 2020. (In Russian).
10. Krendelov MS. Agents of tonsillitis. Modern Problems of Science and Education. 2015;4. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=21081> (In Russian).
11. Odilova GM, Shaikulov KhSh, Yusupov MI. Clinical and bacteriological characteristics of staphylococcal diarrhea in infants. Vestnik vracha. 2020;4(97):70-3. (In Russian).
12. Prisakar VI, Buga DV, Sava VI. Vnutribol'nichnye infektsii, vyzvannye metitsillinrezistentnymi stafilakokkami (mrs). Klinicheskaya meditsina. 2018;12. (In Russian).

References

НОВОСТИ НАУКИ

Метод получения живых аттенуированных ДНК-вирусов с дефектом репликации для разработки вакцин

Разработка химически аттенуированной, некомпетентной к репликации вирусной вакцины может обеспечить защиту от заболеваний, вызываемых ДНК-содержащими вирусами. Разработан метод получения живых аттенуированных вирусов с дефектом репликации с использованием центанамицина (СМ), химического соединения, которое алкилирует малую бороздку ДНК, богатую АТ, и тем самым блокирует репликацию ДНК. Проверена эффективность СМ для получения живых аттенуированных репликационно-дефектных цитомегаловирусов человека, мышинных цитомегаловирусов и вируса простого герпеса-2 (HSV-2), предполагающая широкое применение для получения живых аттенуированных репликационно-дефектных ДНК-вирусов. Масс-спектрометрический анализ показал, что СМ алкилируют вирусную ДНК в положении аденин-N3. Более того, иммунизация мышей СМ-аттенуированным мышинным цитомегаловирусом (MCMV) вызывала сильный иммунный ответ и снижала вирусную нагрузку у иммунизированных животных при заражении живым MCMV дикого типа. Данное исследование предлагает объединяющую и привлекательную терапевтическую возможность, заключающуюся в том, что химически аттенуированные живые ДНК-вирусы могут быть легко разработаны в качестве новых передовых вакцин.



Jaijyan D.K., et al. A chemical method for generating live-attenuated, replication-defective DNA viruses for vaccine development. *Cell Reports Methods*. 2022;9(2):100287.

Мышиная модель пищевой листериозной инфекции, вызываемая *Listeria monocytogenes*

А.И.Борзилов, О.В.Коробова, Т.И.Комбарова, Е.С.Перескокова, Е.А.Ганина

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Разработана модель пищевой инфекции у мышей линии BALB/c с антибиотик-индуцированным дисбиозом кишечника, вызываемой двумя штаммами *Listeria monocytogenes* – MA554 и BB1. Внутривентрикулярное введение культур листерий в дозе 10^8 КОЕ приводит к длительной персистенции листерий в желудочно-кишечном тракте мышей. Летальность среди инфицированных животных составляет 20–40%. В ходе исследований была определена динамика колонизации кишечника интактных мышей и мышей с дисбиозом кишечника культурами *L. monocytogenes* MA554 и *L. monocytogenes* BB1, изучены патоморфологические изменения и функциональные нарушения в органах. Пригодность разработанных моделей кишечного листериоза у мышей была проверена в экспериментах по лечению. В качестве антибактериальных препаратов использовали антибиотики, активные *in vitro* в отношении тест-штаммов листерий, – ко-тримоксазол и комбинацию ампициллина с гентамицином. Показано, что антибиотикотерапия пищевой листериозной инфекции, начатая через 3 ч после заражения, повышает выживаемость подопытных животных и санирует их организм от бактерий *L. monocytogenes*. Более позднее начало терапии (через 3 суток после инфицирования) приводит к менее выраженному защитному действию и снижает обсемененность фекалий клетками листерий. Полученные нами результаты свидетельствуют о пригодности разработанной нами мышиной модели пищевой листериозной инфекции для оценки эффективности антибактериальных препаратов *in vivo*.

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, мышиная модель, листериоз, пищевая инфекция, антибиотикотерапия

Для цитирования: Борзилов А.И., Коробова О.В., Комбарова Т.И., Перескокова Е.С., Ганина Е.А. Мышиная модель пищевой листериозной инфекции, вызываемая *Listeria monocytogenes*. Бактериология. 2022; 7(4): 44–56. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-44-56

Mouse model of nutritional listeria infection caused by *Listeria monocytogenes*

A.I.Borzilov, O.V.Korobova, T.I.Kombarova, E.S.Pereskokova, E.A.Ganina

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

A model of foodborne infection in BALB/c mice with antibiotic-induced intestinal dysbiosis caused by two strains of *Listeria monocytogenes*, MA554 and BB1, was developed. Intra-gastric administration of listeria cultures at the dose of 10^8 CFU leads to long-term persistence of listeria in the gastrointestinal tract of mice. Mortality among infected animals is 20–40%. The dynamics of colonization of the intestines of intact mice and mice with intestinal dysbiosis by *L. monocytogenes* MA554 and *L. monocytogenes* BB1 cultures has been determined and pathomorphological changes and functional disorders in organs have been studied. The suitability of the developed models of intestinal listeriosis in mice has been tested in treatment experiments. Antibiotics active *in vitro* against listeria test strains have been used as antibacterial drugs – co-trimoxazole and a combination of ampicillin with gentamicin. It has been shown that antibiotic therapy of foodborne listeriosis infection, started 3 hours after infection, increases the survival rate of experimental animals and sanitizes their body from *L. monocytogenes* bacteria. A later start of therapy (3 days after infection) leads to a less pronounced protective effect and reduces the contamination of faeces with listeria cells. Our results indicate the suitability of the mouse model of food-borne listeriosis infection for evaluating the effectiveness of antibacterial drugs *in vivo*.

Key words: *Listeria monocytogenes*, mouse model, listeriosis, foodborne infection, antibiotic therapy

For citation: Borzilov A.I., Korobova O.V., Kombarova T.I., Pereskokova E.S., Ganina E.A. Mouse model of nutritional listeria infection caused by *Listeria monocytogenes*. Bacteriology. 2022; 7(4): 44–56. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-44-56

Для корреспонденции:

Борзилов Александр Иосифович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 360-147
E-mail: borzilov@obolensk.org

Статья поступила 30.11.2022 г., принята к печати 28.12.2022 г.

For correspondence:

Alexander I. Borzilov, PhD, Leading Researcher of the Biological Testing Laboratory, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 360-147
E-mail: borzilov@obolensk.org

The article was received 30.11.2022, accepted for publication 28.12.2022

Бактерии *Listeria monocytogenes* являются возбудителями пищевой инфекции у человека. Они широко распространены в природе и способны длительное время выживать в окружающей среде [1]. Основным путем заражения людей листериозом – алиментарный, т.е. через продукты питания [2, 3]. Среди возбудителей пищевых инфекций листериоз не занимает лидирующих позиций, как, например, сальмонеллез или кампилобактериоз, но склонен к более тяжелому клиническому течению и худшему прогнозу [4, 5]. Смертность среди людей, заболевших листериозом, может достигать 30% [6, 7]. Тяжесть листериозной инфекции и разнообразие форм ее проявления во многом связаны со способностью листерий проникать из кишечника внутрь макроорганизма и преодолевать гематоэнцефалический и плацентарный барьеры [6, 8]. В группу риска по заболеваемости листериозом входят люди со сниженным иммунитетом [9, 10], дети и старики [11, 12], беременные женщины [13].

Нормальная микрофлора кишечника человека препятствует его колонизации клетками *L. monocytogenes*. Изменение состава микробиоты под воздействием антибиотиков снижает защиту слизистой оболочки кишечника и подавляет иммунную систему организма [14, 15]. В этих случаях листериоз может развиваться даже при очень низкой заражающей дозе патогена [16].

Важную роль в защите кишечника от патогенных микроорганизмов играют бактерии нормофлоры, которые являются продуцентами бактериоцинов и подавляют патогенные микроорганизмы, в т.ч. и *L. monocytogenes* [17–19]. Длительная персистенция *L. monocytogenes* в кишечнике человека связана с их природной способностью формировать биопленки [20].

Трудности терапии листериоза связаны со способностью возбудителя к внутриклеточной и внеклеточной персистенции, а также с природной устойчивостью к некоторым антибиотикам [7, 13, 21]. Многочисленные исследования показали, что большинство штаммов *L. monocytogenes* чувствительны к действию β-лактамовых антибиотиков пенициллинового ряда, аминогликозидам, тетрациклином, гликопептидам, фторхинолонам последнего поколения, макролидам, карбапенемам, триметоприм/сульфаметоксазолу, но устойчивы к цефалоспорином и гентамицину [22–26]. Доля полирезистентных штаммов листерий различного происхождения составляет от 23 до 49% [24, 25].

Традиционные схемы антибиотикотерапии листериоза включают использование пенициллина и ампициллина отдельно или в комбинации с гентамицином [27, 28]. Синергизм этих препаратов показан в экспериментах *in vitro* [29, 30]. Также для лечения применяют амоксициллин, ко-тримоксазол, эритромицин, доксициклин, левомицетин [31, 32].

Разработка эффективных противолisterиозных препаратов и схем их применения напрямую связана с проведением исследований *in vivo*. Наиболее распространенная животная модель листериозной кишечной инфекции – мышиная модель. Однако воспроизведение экспериментального листериоза при внутрижелудочном способе заражения, как правило, требует введения большой дозы культуры вирулентного штамма. Так, например, для моделирования нелетальной пищевой листериозной инфекции мышью заражают культурой *L. monocytogenes* в дозе 10^8 – 10^{10} КОЕ [33]. Использование в качестве модельных животных мышью с индуцированным

иммунодефицитом позволяет существенно снизить инфицирующую дозу. Показано, что заражающая доза штамма *L. monocytogenes* F5817 (серотип 4b) при внутрижелудочном введении иммунокомпетентным мышам линии C57Bl/6j приблизительно на 4 порядка выше, чем для тех же мышью с индуцированным иммунодефицитом [34].

Различные линии мышью отличаются по восприимчивости к листериозной инфекции. Мыши линий A/J, BALB/c, By/J значительно более чувствительны к кишечной листериозной инфекции, чем мыши C57Bl/6. Экспериментальные данные показали, что LD₅₀ *L. monocytogenes* Scott A (серотип 4b) при внутрижелудочном введении мышам линии A/J составляет 10^6 КОЕ, а мышам линии C57Bl/6 – 10^8 КОЕ [35]. Различия в составе микробиоты кишечника, способной повлиять на восприимчивость к инфекции, у этих линий мышью отсутствовали [36].

Большинство штаммов *L. monocytogenes*, используемых для моделирования кишечной инфекции, были авирулентны для мышью, что заставляло исследователей применять высокую (10^8 КОЕ) заражающую дозу [37]. Однако имеется сообщение о более вирулентных штаммах, способных вызывать генерализованную инфекцию у здоровых мышью при низких заражающих дозах (LD₅₀ = $3,16 \times 10^3$ КОЕ) при введении в желудок. Важно отметить, что одни штаммы оказались более вирулентными при внутрибрюшинном введении, а другие – при внутрижелудочном [38].

Внутрижелудочное заражение беременных самок аутбредных мышью CD-1 используют для исследования способности листерий преодолевать плацентарный барьер, вызывая тем самым внутриутробную колонизацию, потерю плода или неонатальные осложнения. Диссеминация клеток штаммов *L. monocytogenes* F6214-1, PAS351 и F6212 серотипа 4b, а также штамма 10403S серотипа 1/2a в дозе 10^8 и 10^9 КОЕ происходила уже через 48–74 ч после инфицирования [39, 40].

Целью наших исследований была разработка модели пищевой листериозной инфекции у мышью линии BALB/c, пригодность которой для оценки эффективности антибактериальных препаратов была проверена в экспериментах по антибиотикотерапии листериоза.

Материалы и методы

Бактериальные культуры

В работе использовали два штамма *L. monocytogenes* из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск»: штамм МА554 (инв. № В-9071) и штамм ББ1 (инв. № В-7495). Оба штамма чувствительны к ампициллину (≤ 1 мкг/мл), гентамицину (МПК ≤ 4 мкг/мл), ко-тримоксазолу (МПК $\leq 0,06$ мкг/мл по триметоприму).

Питательные среды, антибиотики

Для культивирования штаммов *L. monocytogenes* использовали плотную питательную среду №1 ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) с добавлением 2% гемолизированной крови. Питательную среду Мюллера–Хинтона с добавлением 1% глюкозы (Hi-Media, Индия) применяли для определения чувствительности бактериальных штаммов к антибиотикам. В качестве селективной среды для выявления листерий в фекалиях мышью использовали агаризированную среду ПАЛ с селективной добавкой (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия).

Стрептомицина сульфат (ГК «Бионит», Россия) назначали животным для индуцирования дисбиоза кишечника у мышей.

Ампициллина натриевая соль (PanReac Appli Chem, Испания), гентамицин (KRKA, Словения) и ко-тримоксазол (Biocraft, Германия) являлись препаратами для лечения экспериментального листериоза.

Лабораторные животные

В экспериментах *in vivo* в качестве модельных животных использовали мышей линии BALB/c (самцы/самки, вес 15–18 г). Модельных животных содержали в стандартных условиях в соответствии с международными нормами и требованиями. Мыши имели свободный доступ к воде и корму (ООО «Лабораторкорм», Москва). Мышей размещали в поликарбонатных клетках (Lab Products Inc., США) группами не более 6 животных в каждой. За животными велось ежедневное ветеринарное наблюдение. Умерших в процессе эксперимента мышей удаляли из клеток по мере обнаружения.

Моделирование дисбактериоза кишечника у мышей

Для подавления нормальной микрофлоры кишечника подопытным мышам давали антибиотик стрептомицин, который широко используют для моделирования бактериальных кишечных инфекций [41]. Препарат давали животным с питьевой водой (5 г/л) в течение 5 дней до заражения.

Заражение лабораторных животных

Бактериальную взвесь для инфицирования животных готовили из ночной агаровой культуры. Выросшие характерные колонии суспендировали в физиологическом растворе, содержащем 1/15 М калий-натриевый фосфатный буфер с рН 7,2. Бактериальные взвеси доводили до плотности 3,7 по стандарту оптической мутности МакФарланда, что приблизительно соответствует 2×10^9 КОЕ/мл. Затем делали последовательные разведения суспензий до достижения необходимой концентрации клеток *L. monocytogenes*. Культуры вводили мышам внутрижелудочно в объеме 0,5 мл с помощью металлического изогнутого зонда соответствующего размера (Stanford Equipment, США). Контроль количества клеток во взвеси осуществляли путем высева по 0,1 мл из соответствующих разведений исходной взвеси на плотную питательную среду №1 ГРМ с добавлением гемолизированной крови. Посевы инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°C.

Изучение динамики пищевой листериозной инфекции

Развитие кишечной листериозной инфекции исследовали на мышах линии BALB/c, заражая их внутрижелудочно культурами исследуемых штаммов в дозах 10^7 и 10^8 КОЕ. Для повышения чувствительности к листериозной инфекции перед заражением животным из опытных групп давали в течение 5 дней стрептомицин с питьевой водой. За сутки до заражения и далее животным давали воду без стрептомицина. Контрольные животные на протяжении всего эксперимента не получали антибиотика.

Динамику колонизации кишечника листериями у экспериментальных животных оценивали по степени обсемененности фекалий этими бактериями через 3 ч и ежедневно в течение 14 дней после заражения.

Для выявления функциональных и морфологических изменений внутренних органов в процессе развития пищевой листериозной инфекции через 7 дней после инфицирования делали общий и биохимический анализ крови. В это же время

проводили гистологические исследования внутренних органов мышей – тонкого и толстого кишечника, печени, селезенки, тимуса, легких, головного мозга.

Клинический анализ крови

Общий анализ крови проводили на автоматическом гематологическом анализаторе PCE-90Vet (High Technology, США) в соответствии с руководством по использованию прибора. Для сбора крови применяли микропробирки с K2-ЭДТА.

Биохимический анализ крови

Биохимический анализ крови (аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), общий белок, глюкоза, креатинин) проводили на полуавтоматическом биохимическом анализаторе StatFax-3300 (Awareness Technology, США) с использованием жидких реактивов UTS (ООО «Юнимед», Россия).

Сбор и анализ фекалий

Мышей (5 голов) из клетки содержания пересаживали в стерильные клетки без подстила, корма и воды. Через 30–40 мин после пересадки животных возвращали в клетки для содержания. Фекалии, оставшиеся на дне клетки от исследуемой группы, стерильным пинцетом собирали в маркированные микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф, взвешивали и передавали для проведения бактериологического анализа.

Фекалии мышей растирали в стерильных фарфоровых ступках с добавлением кварцевого песка и физиологического раствора до получения однородной суспензии с концентрацией 0,1 г/мл. Полученные гомогенаты (цельные и их десятикратные разведения) высевали на поверхность питательного агара. В качестве питательной среды для выявления культуры листерий использовали питательную среду – ПАЛ-агар с селективной добавкой. Посевы инкубировали при температуре 37°C в течение 24 ч.

Гистологическое исследование органов и тканей

Гистологические исследования проводили через 7 дней после заражения мышей BALB/c. В качестве контроля использовали интактных мышей той же линии. Исследовали тонкий и толстый кишечника, печень, селезенку, тимус, легкие и головной мозг.

Полученные образцы помещали во флакон с 50 мл 4%-го раствора параформа. Через 24 ч экспозиции раствор параформа заменяли на свежий. Исследованию подвергали гистологические срезы органов, окрашенные гематоксилином и эозином по стандартной методике. Анализ гистологических препаратов проводили с использованием микроскопа Nikon Eclipse 80i и программы анализа изображения NIS Elements F4.60.00. Определяли наличие признаков воспалительно-некротических изменений в исследуемых образцах.

Антибиотикотерапия летальной листериозной инфекции

Валидацию разработанных моделей кишечной листериозной инфекции проводили на примере их антибиотикотерапии. В качестве инфицирующих тест-штаммов использовали *L. monocytogenes* ББ1 и *L. monocytogenes* МА554, поскольку они оказались наиболее патогенными для мышей, интенсивно колонизировали кишечник животных и более длительное время персистировали в нем. Перед заражением в течение 5 дней все животные получали с питьевой водой стрептомицин. Для заражения мышей линии BALB/c (самцы/самки, 16–18 г) использовали суточные агаровые культуры листерий, выра-

ценные на плотной питательной среде при температуре 37°C, заражающая доза – 10⁸ КОЕ.

Для лечения экспериментальной листериозной инфекции использовали ко-тримоксазол или комбинацию ампициллина с гентамицином. Лечение различных групп животных начинали через 3 ч (экстренная терапия) или 72 ч (отложенная терапия) после заражения. Продолжительность курса лечения – 5 дней. Разовые дозы ампициллина, гентамицина и ко-тримоксазола составили 100, 20 и 250 мг/кг (по триметоприму) соответственно. Ампициллин и гентамицин вводили мышам подкожно отдельно по 0,2 мл 2 раза в сутки. Ко-тримоксазол назначали внутривентрикулярно один раз в день.

Экспериментальные группы мышей №1 и №2 лечили ко-тримоксазолом, а №3 и №4 – ампициллином с гентамицином. Лечение в группах №1 и №3 начинали через 3 ч после заражения, в группах №2 и №4 – на 3-и сутки инфекции. Контрольную группу мышей не лечили. Все группы включали 10 мышей, предварительно обработанных стрептомицином. За животными наблюдали в течение 10 дней с момента заражения, отмечая случаи гибели. В конце срока наблюдения собирали фекалии (пулами) от мышей из экспериментальных и контрольных групп для определения количества в них клеток *L. monocytogenes*. Кроме того, после эвтаназии выживших определяли наличие патогена в селезенке и головном мозге мышей. Эффективность лечения экспериментального листериоза оценивали по степени санации кишечника, наличию клеток патогена в органах и выживанию инфицированных мышей.

Статистические методы

Статистическую обработку результатов (вычисление среднего арифметического значения и стандартного отклонения, двухсторонний критерий Стьюдента) проводили с использованием статистических ресурсов программы Microsoft Excel 2010 и статистической программы Statistica 10.

Результаты исследования

Модель пищевой листериозной инфекции у мышей

Изучение динамики развития кишечной листериозной инфекции у мышей показало, что предварительная обработка

животных стрептомицином (группа SM+) способствует более эффективной персистенции листерий в кишечнике по сравнению с контролем. В первые 6 суток после заражения мышей культурой штамма *L. monocytogenes* MA554 концентрация листерий в фекалиях животных держалась на уровне 6,0 LOG₁₀ КОЕ/г у опытных и контрольных животных (табл. 1). Однако начиная с 7-х суток количество клеток *L. monocytogenes* MA554 в фекалиях животных группы SM+ возрастало и достигало 8,41 LOG₁₀ КОЕ/г к 10-м суткам, тогда как у контрольных животных рост обсемененности был незначительным – до 6,88 LOG₁₀ КОЕ/г. К концу наблюдения обсемененность фекалий у мышей из экспериментальной группы снижалась до 7,77 LOG₁₀ КОЕ/г, у мышей контрольной группы – до 6,63 LOG₁₀ КОЕ/г.

Снижение заражающей дозы *L. monocytogenes* MA554 до 10⁷ КОЕ приводило к более низкому уровню колонизации кишечника мышей. Количество листерий в фекалиях мышей после инфицирования в группе SM+ постепенно снижалось с 1-х суток (7,08 LOG₁₀ КОЕ/г) по 7-е сутки (5,85 LOG₁₀ КОЕ/г) и далее не изменялось до 14-х суток (табл. 1). В контрольной группе через сутки после заражения концентрация листерий в фекалиях составляла 4,32 LOG₁₀ КОЕ/г, а через 2 нед. опускалась до 3,94 LOG₁₀ КОЕ/г.

Следует отметить, что в экспериментальной и контрольной группах выпало по одной мыши на 4-е и 8-е сутки соответственно.

Внутрижелудочное введение культуры штамма *L. monocytogenes* ББ1 в дозе 10⁸ КОЕ мышам линии BALB/c с антибиотик-индуцированным дисбиозом приводило к устойчивой персистенции листерий в кишечнике в течение первых 10 дней: концентрация листерий в фекалиях держалась на высоком уровне – от 6,67 до 8,92 LOG₁₀ КОЕ/г (табл. 2). Максимальный уровень колонизации был на 3-и сутки после введения культуры. К 14-му дню инфекции содержание клеток *L. monocytogenes* ББ1 в каловых массах мышей снижалось до 4,71 LOG₁₀ КОЕ/г.

У здоровых (контрольных) мышей до 13-х суток экспериментальной инфекции количество клеток листерий было на 1–3 порядка ниже, чем у мышей с дисбактериозом. Максимальный показатель обсемененности фекалий листе-

Таблица 1. Обсемененность (LOG₁₀ КОЕ/г) фекалий клетками *L. monocytogenes* MA554 инфицированных мышей линии BALB/c

Доза заражения	Группа	Сутки после заражения											
		3 ч	1	2	3	6	7	8	9	10	13	14	
10 ⁸ КОЕ	Sm+	7,99	6,37	6,01	6,03	6,07	7,88	8,3	8,33	8,41	8,28	7,77	
	Контроль	8,22	5,03	5,7	6,07	6,07	6,07	6,82	6,86	6,88	6,56	6,63	
10 ⁷ КОЕ	Sm+	6,75	7,08	6,75	-	-	5,85	-	-	5,33	-	5,26	
	Контроль	7,55	4,32	4,38	-	-	5,77	-	-	4,81	-	3,94	

Таблица 2. Обсемененность (LOG₁₀ КОЕ/г) фекалий клетками *L. monocytogenes* ББ1 инфицированных мышей линии BALB/c (самцы/самки)

Доза заражения	Группа	Сутки после заражения											
		3 ч	1	2	3	6	7	8	9	10	13	14	
10 ⁸ КОЕ	Sm+	7,97	7,78	8,06	8,92	6,67	7,12	7,25	7,31	7,34	6,54	4,71	
	Контроль	8,71	6,29	6,34	7,54	6,05	5,52	5,54	5,53	5,56	3,7	<2	
10 ⁷ КОЕ	Sm+	5,52	6,31	8,57	-	-	6,16	-	-	7,36	-	4,67	
	Контроль	7,78	4,37	7,15	-	-	5,42	-	-	5,26	-	<2	

риями был отмечен на 1-е сутки после заражения – 8,71 LOG₁₀ КОЕ/г. К концу 2-й недели уровень контаминации фекалий клетками *L. monocytogenes* ББ1 у мышей из контрольной группы снижалась ниже чувствительности метода (<100 КОЕ/г).

Снижение заражающей дозы *L. monocytogenes* ББ1 до 10⁷ КОЕ практически не отразилось на характере колонизации кишечника листериями. У мышей, обработанных стрептомицином, максимальная концентрация клеток бактерий этого штамма в фекалиях была на 3-и сутки после заражения – 8,57 LOG₁₀ КОЕ/г. В контроле этот показатель составлял на 1,5 порядка ниже – 7,15 LOG₁₀ КОЕ/г. К 14-м суткам в группе Sm+ количество листерий в каловых массах мышей снижалось до 4,67 LOG₁₀ КОЕ/г, а у интактных животных листерии отсутствовали (табл. 2).

Общий анализ крови, проведенный на 7-е сутки после внутрижелудочного заражения мышей линии BALB/c культурами штаммов ББ1 и МА554 в дозе 10⁸ КОЕ, не выявил статистически значимых изменений (*p* > 0,05) в формуле крови животных по сравнению с контрольными животными (табл. 3).

На 7-е сутки инфекции также оценивали некоторые биохимические показатели крови (АЛТ, АСТ, ЩФ, общий белок, глюкоза) у мышей, инфицированных тест-штаммами *L. monocytogenes*. Полученные результаты показали, что заражение штаммом ББ1 не приводило к достоверным (*p* > 0,05) изменениям количества печеночных ферментов, общего белка и глюкозы (табл. 4). В то же время у мышей, зараженных культурой *L. monocytogenes* МА554, наблюдалось статистически значимое повышение количества общего белка (*p* < 0,01) и АЛТ (*p* < 0,005), снижение уровня ЩФ (*p* < 0,01) в сыворотке крови по сравнению с контролем.

Результаты биохимического анализа крови мышей, инфицированных культурами патогенных листерий, показали, что штамм МА554 вызывает функциональные отклонения в печени по сравнению со штаммом ББ1, следовательно, характер экспериментальной листериозной инфекции у мышей зависит от штамма-возбудителя.

Через неделю после внутрижелудочного заражения мышей линии BALB/c культурами *L. monocytogenes* ББ1 и *L. monocytogenes* МА554 в дозе 10⁸ КОЕ было проведено гистологическое исследование внутренних органов мышей (тонкий кишечник, толстый кишечник, печень, селезенка, тимус, легкие, головной мозг) с целью выявления патоморфологических изменений.

Микроскопическое исследование срезов тонкого кишечника мышей, зараженных штаммом ББ1, выявило увеличение количества бокаловидных клеток в эпителиальном слое кишечных ворсинок по сравнению с контролем. Кроме того, сами клетки увеличены в размерах. В просвете кишечника определяется большое количество слизи. В ворсинках имеется клеточная инфильтрация собственной пластинки слизистой. Инфильтрат состоит из лимфоцитов, количество которых несколько увеличено по сравнению с контролем (рис. 1А).

В случае штамма МА554 в эпителии слизистой оболочки тонкой кишки встречаются единичные бокаловидные клетки, которые слабо заметны среди цилиндрических клеток. Изменения в собственной пластинке слизистой оболочки отличаются от контроля высокой интенсивностью клеточной

Таблица 3. Показатели крови мышей линии BALB/c из контрольных и опытных групп на 7-й день после заражения культурой *L. monocytogenes* ББ1 и МА554 в дозе 10⁸ КОЕ

Показатель	Ед. изм.	Контроль	<i>L. monocytogenes</i>	
			штамм ББ1	штамм МА554
Лейкоциты	×10 ⁹ /л	6,2 ± 1,6	8,9 ± 3,9	6,4 ± 2,6
Лимфоциты	×10 ⁹ /л	3,9 ± 1,2	3,1 ± 1,7	2,7 ± 0,5
Моноциты	×10 ⁹ /л	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,1
Гранулоциты	×10 ⁹ /л	2,1 ± 1,0	5,4 ± 3,2	3,3 ± 2,1
Лимфоциты	%	63,0 ± 12,3	36,7 ± 16,0	45,7 ± 10,5
Моноциты	%	4,0 ± 0,9	4,3 ± 1,3	5,2 ± 0,7
Гранулоциты	%	33,1 ± 11,5	59,0 ± 17,1	49,1 ± 11,1
Эритроциты	×10 ¹² /л	9,85 ± 0,44	9,92 ± 1,50	9,46 ± 0,56
Гемоглабин	г/л	142 ± 6	142 ± 17	138 ± 9
Гематокрит %	%	44,2 ± 2,5	44,9 ± 6,2	43,6 ± 2,7
Средний объем эритроцита	фл	44,9 ± 0,9	45,4 ± 0,6	46,1 ± 0,6
Среднее содержание гемоглобина в эритроцитах	пг	14,4 ± 0,2	14,3 ± 0,5	14,6 ± 0,3
Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах	г/л	321 ± 8	315 ± 6	316 ± 4
Ширина распр. эритроцитов	–	20,8 ± 3,5	18,3 ± 3,5	16,4 ± 2,5
Тромбоциты	×10 ⁹ /л	638 ± 90	589 ± 171	746 ± 247
Средний объем тромбоцита	фл	4,6 ± 0,2	4,8 ± 0,2	5,0 ± 0,3
Ширина распр. тромбоцитов		16,0 ± 0,3	16,0 ± 0,5	16,6 ± 0,5
Тромбокрит	%	0,290 ± 0,039	0,283 ± 0,075	0,376 ± 0,142

В таблице представлены средние значения (*n* = 5) и стандартные отклонения.

инфильтрации, а также изменением клеточного состава инфильтрата. Наряду с лимфоцитами в инфильтрате содержится большое количество плазматических клеток (рис. 1Б).

У контрольных животных покровный эпителий слизистой оболочки кишки состоит из плотно расположенных высоких цилиндрических клеток. Бокаловидные клетки, другой тип входящих в эпителиальный слой клеток, т.е. клетки, выделяющие слизь, встречаются редко, имеют небольшие размеры. Под эпителием кишечных ворсинок, в собственной пластинке слизистой оболочки, находится небольшое количество лимфоцитов (рис. 1В).

Гистологическое исследование срезов толстого кишечника мышей, зараженных культурой *L. monocytogenes* ББ1, выявило увеличение количества и размера бокаловидных клеток по сравнению с контролем. В просвете кишки содержится много слизи. Инфильтрация стромы слизистой оболочки сохраняется на уровне контроля и по интенсивности инфильтрации и по клеточному составу (рис. 2А).

Внутрижелудочное введение мышам BALB/c культуры *L. monocytogenes* МА554 приводило к увеличению количества бокаловидных клеток в слизистой оболочке толстого кишеч-

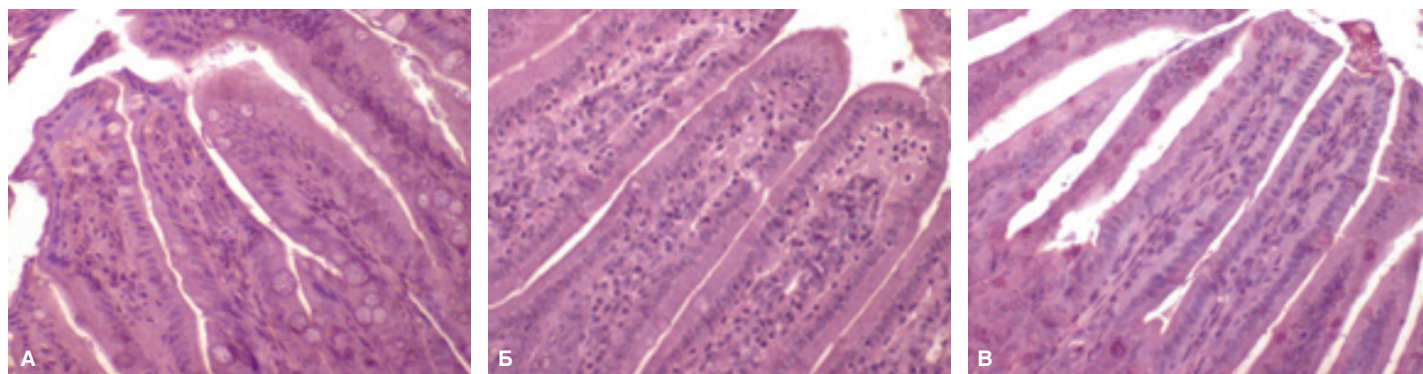


Рис. 1. Микрофотографии срезов тонкой кишки мышей BALB/c, инфицированных *L. monocytogenes*.

А – *L. monocytogenes* ББ1. Повышенное содержание бокаловидных клеток в эпителии кишечных ворсинок. Увеличение $\times 20$; Б – *L. monocytogenes* МА554. Выраженная клеточная инфильтрация собственной пластинки слизистой. Увеличение $\times 20$; В – Контроль (без заражения). Норма. Увеличение $\times 20$.

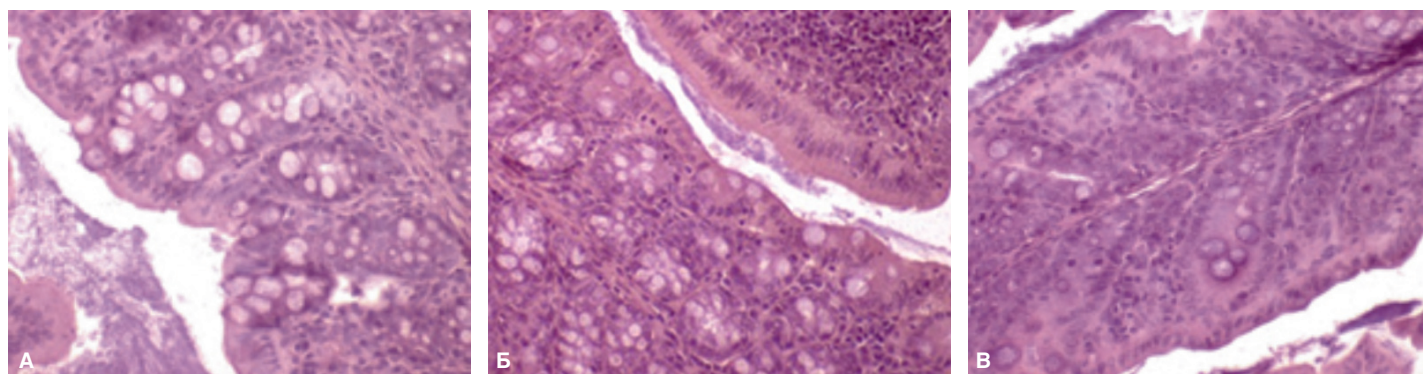


Рис. 2. Микрофотографии срезов толстой кишки мышей BALB/c, инфицированных *L. monocytogenes*.

А – *L. monocytogenes* ББ1. Повышенное содержание бокаловидных клеток большого размера. Увеличение $\times 20$; Б – *L. monocytogenes* МА554. Слизистая содержит небольшое количество бокаловидных клеток. Выраженная клеточная инфильтрация стромы толстой кишки. Увеличение $\times 20$; В – Контроль (без заражения). Норма. Увеличение $\times 20$.

ника по сравнению с контролем. Однако размер бокаловидных клеток и содержание слизи в просвете кишечника меньше, чем при заражении штаммом ББ1. В строме кишки находится множество лимфоцитов и плазматических клеток (рис. 2Б).

У контрольных животных слизистая оболочка имеет обычное строение и содержит большое количество бокаловидных клеток, что в норме характерно для толстой кишки. В строме складок имеется небольшое количество лимфоцитов, плазматических клеток и единичных полиморфноядерных лейкоцитов (рис. 2В).

При микроскопическом исследовании срезов печени мышей, инфицированных *L. monocytogenes* ББ1, было установлено, что в паренхиме имеются мелкие скопления гистиоцитов – клеток округлой и вытянутой формы. Редко встречаются более крупные очаги этих клеток. Наряду с гистиоцитами в очагах находятся полиморфноядерные лейкоциты, единичные лимфоциты. Отмечается лизис окружающих очаги гепатоцитов. Вне очагов клетки паренхимы сохраняют нормальное строение (рис. 3А).

В случае штамма МА554 в печени в большом количестве обнаруживаются лимфоциты, которые заполняют просветы печеночных капилляров, образуют очаговые рыхлые инфильтраты. Кроме того, встречаются смешанные очаги из лимфоцитов и гистиоцитов. У некоторых мышей в паренхиме печени выявлены обширные участки некротизированной ткани (рис. 3Б).

У интактных животных клетки паренхимы печени, гепатоциты, расположены в виде тяжей, между которыми проходят кровеносные капилляры. В капиллярах находится небольшое количество эритроцитов (рис. 3В).

При гистологическом изучении препаратов селезенки мышей, инфицированных культурой *L. monocytogenes* ББ1, установлено, что красная пульпа – многоклеточная. В красной пульпе появляется большое количество нейтрофилов, тогда как в контроле преобладают лимфоциты. Наблюдаются очаговые скопления макрофагов. Лимфоидных фолликулов меньше, чем в селезенках животных из контрольной группы. Фолликулы имеют небольшие размеры, преимущественно без центров размножения (рис. 4А).

У мышей, зараженных культурой штамма МА554, в селезенке увеличена площадь красной пульпы и белой пульпы по сравнению с контролем. Основными клетками в красной пульпе являются лимфоциты. Кроме того, имеются скопления плазматических клеток, очаги из макрофагов, а также нейтрофилы (рис. 4Б).

В селезенке интактных мышей красная пульпа заполнена лимфоцитами. В поле зрения встречаются единичные полиморфноядерные лейкоциты и плазматические клетки. Лимфоидные фолликулы в белой пульпе небольших размеров, без центров размножения (рис. 4В).

У мышей, инфицированных культурой *L. monocytogenes* ББ1, было обнаружено уменьшение размеров тимуса. Микроскопическое исследование показало уменьшение ши-

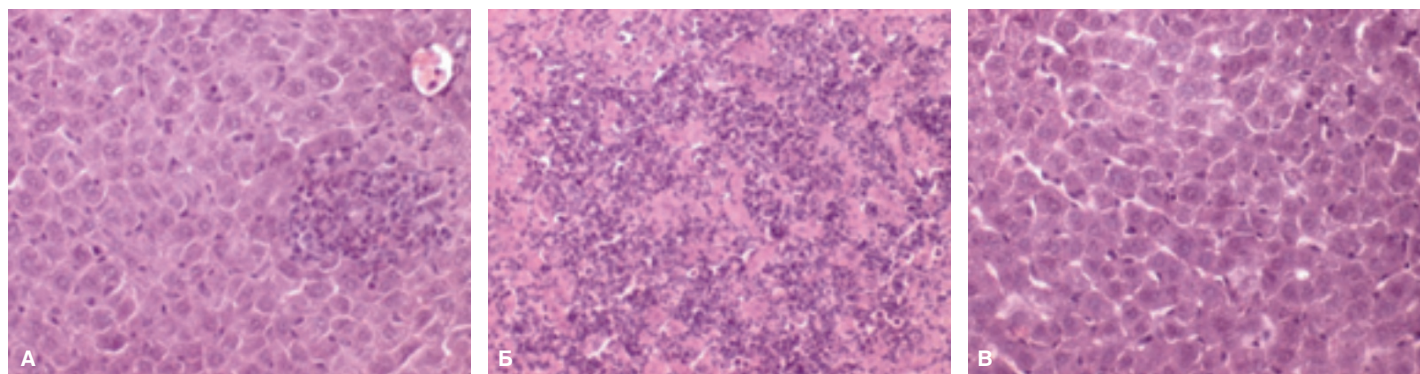


Рис. 3. Микрофотографии срезов печени мышей BALB/c, инфицированных *L. monocytogenes*. А – *L. monocytogenes* ББ1. Мелкие скопления гистиоцитов, лейкоцитов и лимфоцитов. Наблюдается лизис гепатоцитов. Увеличение $\times 20$; Б – *L. monocytogenes* МА554. Обширный участок некроза в паренхиме. Увеличение $\times 20$; В – Контроль (без заражения). Норма. Увеличение $\times 20$.

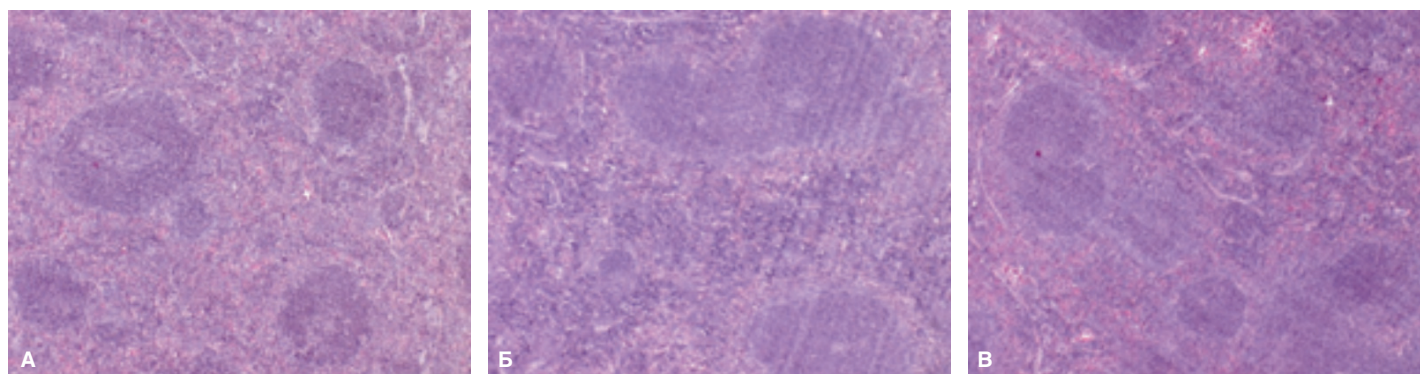


Рис. 4. Микрофотографии срезов селезенки мышей BALB/c, инфицированных *L. monocytogenes*. А – *L. monocytogenes* ББ1. Большое количество нейтрофилов в красной пульпе. Уменьшение количества лимфоидных фолликулов по сравнению с контролем. Увеличение $\times 4$; Б – *L. monocytogenes* МА554. Увеличены размеры лимфоидных фолликулов. Интенсивная инфильтрация лимфоцитами красной пульпы. Увеличение $\times 4$; В – Контроль (без заражения). Норма. Увеличение $\times 4$.

рины корковой зоны в дольках тимуса. У некоторых животных активная убыль лимфоцитов из корковой зоны приводила к состоянию, когда плотность лимфоцитов в корковом веществе становится заметно меньше, чем в мозговом веществе: происходит инверсия слоев (рис. 5А).

Листерозная кишечная инфекция, вызываемая штаммом *L. monocytogenes* МА554, не приводит к изменению величины тимуса по сравнению с контрольными животными. Однако микроскопическое исследование выявило расширение площади коркового вещества в его дольках. Площадь мозгового вещества в тимусе снижена (рис. 5Б).

У контрольных интактных мышей во всех долях тимуса имеется широкий корковый слой, состоящий из большого

количества лимфоцитов, плотно расположенных в эпителиальной ткани. Мозговое вещество в центральной части долек содержит меньшее количество клеток (рис. 5В).

Микроскопическое исследование легких и головного мозга интактных и инфицированных листериозом мышей не выявило в них отклонений от нормы (рис. 6, 7).

Антибиотикотерапия экспериментальной листериозной инфекции

Схемы лечения экспериментальной листериозной инфекции были одинаковы для обоих использованных штаммов *L. monocytogenes* (табл. 5).

Выживаемость мышей, инфицированных культурой *L. monocytogenes* ББ1, в лечебных группах №1 (ко-тримоксазол, 3 ч), №2 (ко-тримоксазол, 72 ч) и №4 (ампициллин + гентамицин, 72 ч) составила 60, 60 и 70% соответственно (рис. 8). Уровень смертности мышей в контрольной группе (без лечения) составил 40%. Хороший лечебный эффект наблюдался в группе животных, которых начинали лечить ампициллином с гентамицином через 3 ч после заражения, все мыши оставались живыми. Гибель животных в лечебных группах наблюдалась в период с 3-х по 7-е сутки, в контрольной – с 3-х по 5-е сутки.

Раннее начало лечения (через 3 ч после заражения) приводило к хорошему санирующему эффекту. В фекалиях всех мышей, выживших на 10-е сутки, листерии отсутствовали. Животные, получавшие ко-тримоксазол или ампициллин с

Таблица 4. Результаты биохимического анализа крови мышей BALB/c после внутрижелудочного введения культур *L. monocytogenes* штаммов ББ1 и МА554 через 7 суток после заражения в дозе 10^8 КОЕ

Показатель	Ед. изм.	Контроль	Штамм ББ1	Штамм МА554
Общий белок	г/л	84,7 ± 0,5	86,7 ± 5,1	94,3 ± 3,2
Глюкоза	ммоль/л	7,78 ± 0,69	6,34 ± 0,24	7,44 ± 0,31
АСТ	МЕ/л	200,9 ± 4,8	179,7 ± 19,2	221,3 ± 41,3
АЛТ	МЕ/л	37,1 ± 0,9	39,5 ± 13,4	57,7 ± 6,0
ЩФ	МЕ/л	230,5 ± 79,8	228,5 ± 8,3	181,8 ± 48,4

В таблице представлены средние значения ($n = 5$) и стандартные отклонения.

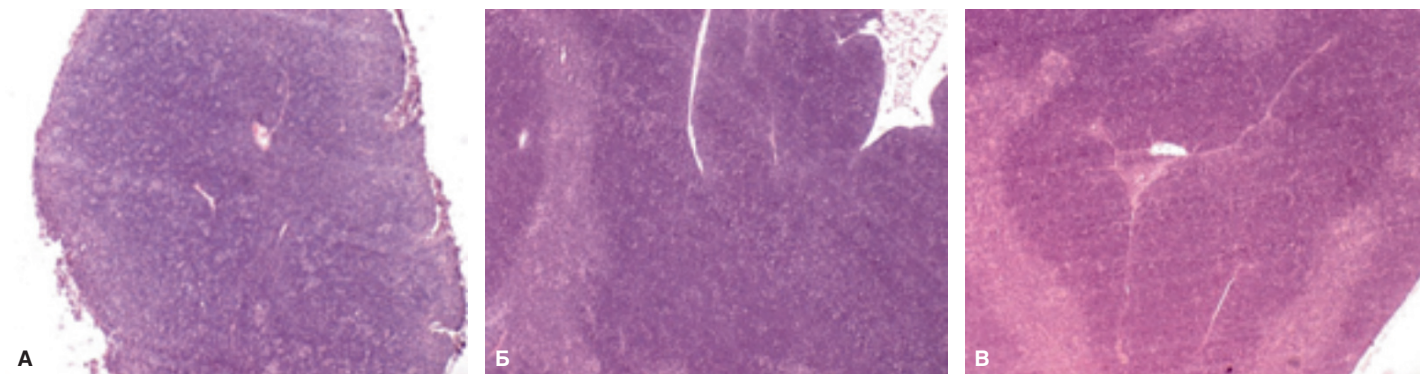


Рис. 5. Микрофотографии срезов тимуса мышей BALB/c, инфицированных *L. monocytogenes*.

А – *L. monocytogenes* ББ1. Значительное уменьшение корковой зоны. Увеличение $\times 4$; Б – *L. monocytogenes* МА554. Гиперплазия коркового вещества. Увеличение $\times 4$; В – Контроль (без заражения). Норма. Увеличение $\times 4$.

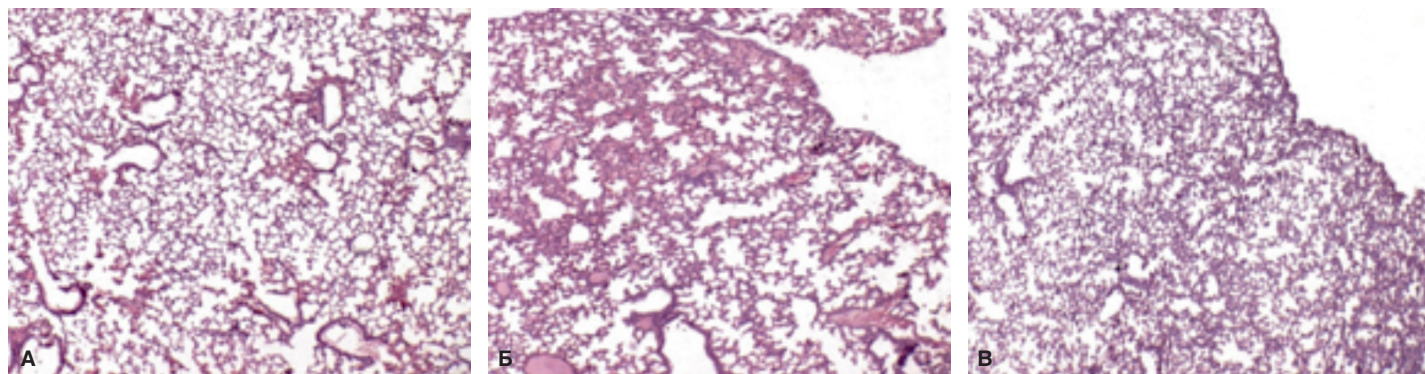


Рис. 6. Микрофотографии срезов легких мышей BALB/c, инфицированных *L. monocytogenes*.

А – *L. monocytogenes* ББ1. Патологические изменения отсутствуют. Увеличение $\times 4$. Б – *L. monocytogenes* МА554. Патологические изменения отсутствуют. Увеличение $\times 4$; В – Контроль (без заражения). Норма. Увеличение $\times 4$.

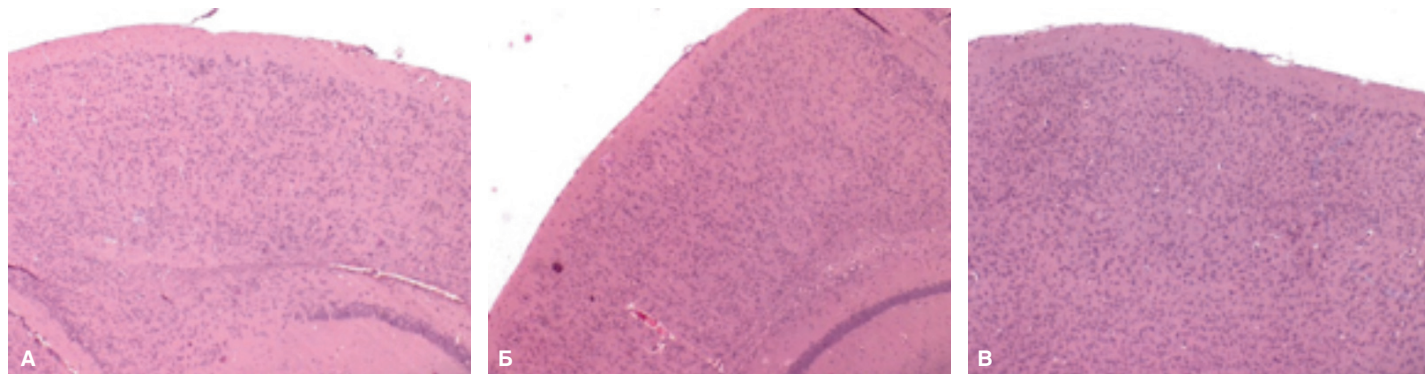


Рис. 7. Микрофотографии срезов головного мозга мышей BALB/c, инфицированных *L. monocytogenes*.

А – *L. monocytogenes* ББ1. Патологические изменения отсутствуют. Увеличение $\times 4$. Б – *L. monocytogenes* МА554. Патологические изменения отсутствуют. Увеличение $\times 4$; В – Контроль (без заражения). Норма. Увеличение $\times 4$.

гентамицином с началом терапии через 72 ч, оставались носителями листерий. Концентрация клеток *L. monocytogenes* ББ1 в фекалиях мышей достигало 4,27 и 3,52 LOG₁₀ КОЕ/г (табл. 6). Однако этот уровень обсемененности каловых масс был значительно ниже, чем у контрольных животных (6,11 LOG₁₀ КОЕ/г). Снижение обсемененности фекалий клетками листерий свидетельствует о терапевтической эффективности поздней антибиотикотерапии. Следует отметить, что у всех выживших животных культура *L. monocytogenes* ББ1 отсутствовала в селезенке и головном мозге, тогда как у павших животных присутствовала.

Антибиотикотерапия пищевой листериозной инфекции, вызываемой внутрижелудочным инфицированием мышей BALB/c культурой *L. monocytogenes* МА554, показала свою эффективность. Лучшие результаты были получены при ран-

нем начале лечения экспериментального кишечного листериоза ко-тримоксазолом (группа №1) или комбинацией ампициллина с гентамицином (группа №3). Выживаемость мышей в обоих случаях составила 100%. Более позднее начало терапии этими препаратами защищало от гибели 90% (группа №2) и 80% (группа №4) животных соответственно. Следует отметить, что уровень смертности среди нелеченых животных был невысоким и составлял 20%. Гибель мышей наблюдалась в период с 3-х по 8-е сутки после заражения (рис. 9).

Бактериологические исследования, направленные на оценку санирующего действия антибактериальных препаратов при лечении экспериментальной кишечной инфекции, вызванной *L. monocytogenes* МА554, установили, что раннее начало применения ко-тримоксазола или комбинации ампициллина с гентамицином приводит к полной элиминации ли-

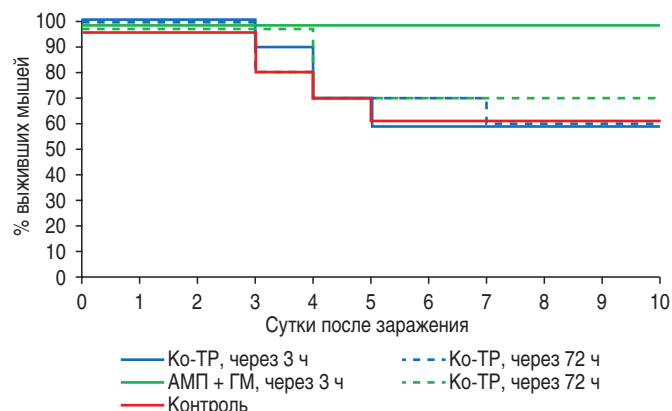


Рис. 8. Выживаемость мышей BALB/c после инфицирования культурой *L. monocytogenes* ББ1 в дозе 10^8 КОЕ и последующей антибиотикотерапии.

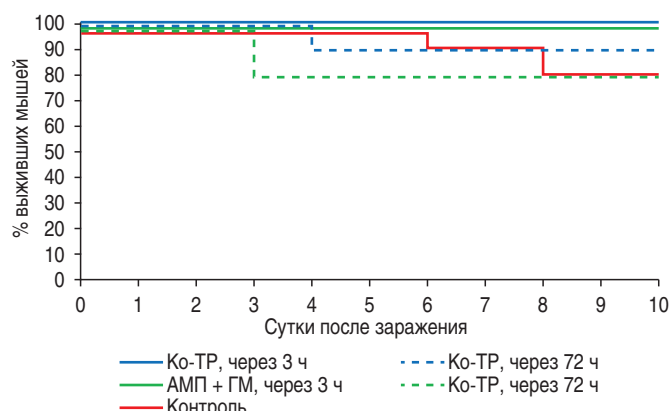


Рис. 9. Выживаемость мышей BALB/c после инфицирования культурой *L. monocytogenes* MA554 в дозе 10^8 КОЕ и последующей антибиотикотерапии.

стерий из кишечника мышей. В фекалиях всех выживших мышей из этих экспериментальных групп культура патогена отсутствовала (табл. 7). Эффективность антибиотикотерапии снижалась при ее начале на 3-и сутки после заражения. Так, например, в группе животных, леченых ампициллином и гентамицином, обсемененность фекалий листериями составляла 3,53 LOG₁₀ КОЕ/г, что, впрочем, приблизительно на 2 порядка ниже, чем в контрольной группе (5,08 LOG₁₀ КОЕ/г).

Санирующее действие ко-тримоксазола при позднем начале терапии кишечной листериозной инфекции было менее выраженным по сравнению с действием ампициллина с гентамицином. Уровень контаминации мышинных фекалий клетками *L. monocytogenes* MA554 был чуть ниже контрольного показателя и достигал 4,85 LOG₁₀ КОЕ/г.

Как и в случае штамма ББ1, у всех выживших мышей *L. monocytogenes* MA554 отсутствовала в селезенке и голов-

ном мозге, в то же время у павших животных возбудитель инфекции обнаруживался в этих органах.

Обсуждение

Модели пищевой (кишечной) инфекции, вызываемые различными штаммами *L. monocytogenes*, достаточно широко используют в исследованиях по оценке специфической активности вакцинных препаратов и антибиотиков, изучению патогенеза листериоза [29, 30, 33–35, 39]. Мыши являются наиболее привлекательным видом лабораторных животных для моделирования благодаря их невысокой стоимости и доступности.

В данной статье мы описали разработанные нами мышинные модели пищевой листериозной инфекции, вызываемые двумя тест-штаммами (MA554 и ББ1) *L. monocytogenes* из

Таблица 5. Схемы лечения экспериментальной листериозной инфекции

№ группы	Препарат	Начало лечения	Разовая доза	Способ введения	Курс, дни	Кол-во мышей в группе
1	Ко-тримоксазол	Через 3 ч	250 мг/кг × 1 р/д	в/ж	5	10
2		Через 72 ч	250 мг/кг × 1 р/д	в/ж	5	10
3	Ампициллин + гентамицин	Через 3 ч	100 + 20 мг/кг × 2 р/д	п/к	5	10
4		Через 72 ч	100 + 20 мг/кг × 2 р/д	п/к	5	10
5	Контроль (без лечения)	–	–	–	–	10

Таблица 6. Эффективность антибиотиков при лечении экспериментальной кишечной листериозной инфекции у мышей линии BALB/c, инфицированных внутрижелудочно культурой *L. monocytogenes* ББ1 в дозе 10^8 КОЕ

Лечение	Обсемененность фекалий на 10-е сутки после заражения, LOG ₁₀ КОЕ/г	Гибель*	Средний срок гибели, сутки
Ко-тримоксазол, 3 ч	<2,0	4/10	4,0
Ко-тримоксазол, 72 ч	4,27	4/10	4,3
Ампициллин + гентамицин, 3 ч	<2,0	0/10	–
Ампициллин + гентамицин, 72ч	3,52	3/10	4,0
Контроль	6,11	4/10	3,8

* указано отношение павших мышей к общему количеству животных в группе.

Таблица 7. Эффективность антибиотиков при лечении экспериментальной кишечной листериозной инфекции у мышей линии BALB/c, инфицированных внутрижелудочно культурой *L. monocytogenes* MA554 в дозе 10^8 КОЕ

Лечение	Обсемененность фекалий на 10-е сутки после заражения, LOG ₁₀ КОЕ/г	Количество павших мышей*	Средний срок гибели, сутки
Ко-тримоксазол, 3 ч	<2,0	0/10	–
Ко-тримоксазол, 72 ч	4,85	1/10	4,0
Ампициллин + гентамицин, 3 ч	<2,0	0/10	–
Ампициллин + гентамицин, 72ч	3,53	2/10	3,0
Контроль	5,08	2/10	4,0

* указано отношение павших мышей к общему количеству животных в группе.

коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск». В предварительных исследованиях было установлено, что эти штаммы вирулентны для мышей линии BALB/c. Среднелетальная доза штаммов MA554 и ББ1 при внутрибрюшинном введении мышам составила $6,9 \times 10^4$ и $7,0 \times 10^4$ КОЕ соответственно. При внутрижелудочном заражении штаммами MA554 и ББ1 в дозе 10^9 КОЕ наиболее чувствительными оказались мыши линий C57BL/6, BALB/c и DBA (данные не представлены). Для моделирования пищевой инфекции мы выбрали мышей линии BALB/c. Другие исследователи также отмечают большую чувствительность к листериозу линейных лабораторных мышей, в т.ч. и мышей BALB/c [35]. Тем не менее относительно невысокая чувствительность иммунокомпетентных модельных животных к листериозу побудила нас повысить чувствительность мышей к инфекции при внутрижелудочном заражении. Хорошо известно, что кишечная микробиота играет важную роль в предотвращении колонизации кишечника болезнетворными микроорганизмами [14]. Подавление нормальной кишечной микрофлоры при применении антибиотиков значительно повышает риск его колонизации патогенными бактериями, в т.ч. *L. monocytogenes*. Поэтому мы индуцировали у мышей BALB/c дисбиоз кишечника по методу, предложенному Wadolowski E.A. et al. [41], с некоторыми изменениями. Мышам давали стрептомицин с питьевой водой в течение 5 дней перед заражением. Благодаря этому мы повысили чувствительность модельных животных к пищевой листериозной инфекции. При этом персистенция листерий в кишечнике мышей продолжалась в течение не менее 14 суток, а обсемененность фекалий клетками листерий была значительно выше, чем в контроле. На 14-е сутки после инфицирования количество клеток *L. monocytogenes* MA554 и *L. monocytogenes* ББ1 в фекалиях мышей составляло 7,77 и 4,71 LOG₁₀ КОЕ/г соответственно. В это же время концентрация листерий в фекалиях мышей с нормальной микрофлорой была более низкой – 6,63 и <2 LOG₁₀ КОЕ/г соответственно. Такую же заражающую дозу для моделирования кишечной листериозной инфекции использовали некоторые другие исследователи [33, 37].

Гистологические исследования органов мышей BALB/c, инфицированных внутрижелудочно культурами *L. monocytogenes* ББ1 и *L. monocytogenes* MA554, выявили некоторые различия в патоморфологических изменениях, связанные с этими штаммами. При сравнении микроскопической картины тонкого кишечника у мышей установлено, что в первом случае культура патогена вызывает раздражающее действие (увеличение количества активных бокаловидных клеток эпителия слизистой оболочки) на кишечник, а во втором – иммунозависимую реакцию (интенсивная инфильтрация лимфоцитами слизистой оболочки). В толстом кишечнике происходят аналогичные изменения. Следует отметить, что у животных, инфицированных культурой *L. monocytogenes* MA554, в отличие от контрольных мышей и мышей, зараженных *L. monocytogenes* ББ1, инфильтрация слизистой оболочки лимфоцитами более выражена, часто встречаются обширные скопления лимфоцитов.

В паренхиме печени мышей, зараженных штаммами ББ1 и MA554, формируются очаги воспаления. Однако штамм MA554 приводит к более тяжелому повреждению печени – образованию обширных некрозов в паренхиме.

На 7-е сутки после инфицирования мышей культурой штамма ББ1 происходит истощение лимфоидной ткани в их селезенке и увеличивается количество нейтрофилов (клеток воспаления) в красной пульпе. В случае штамма MA554 в селезенке наблюдаются признаки иммуностимулирующего действия: усиление пролиферации лимфоцитов в фолликулах и накопление лимфоцитов в белой и красной пульпе.

Гистологическое исследование тимуса мышей, инфицированных внутрижелудочно культурами штаммов листерий ББ1 и MA554, выявило существенные различия: для штамма ББ1 характерно уменьшение количества лимфоцитов в корковой зоне и ее сужение, а для штамма MA554 – увеличение количества лимфоцитов и расширение площади корковой зоны.

Гематологические исследования показали отсутствие значимых отклонений изменения в формуле крови мышей BALB/c, инфицированных штаммами ББ1 и MA554 *L. monocytogenes*. Биохимический анализ крови мышей, инфицированных внутрижелудочно культурами листерий, показал, что через неделю после заражения значительные изменения биохимических показателей крови происходят только в случае штамма *L. monocytogenes* MA554. В сыворотке крови инфицированных животных отмечается повышение уровня АЛТ, общего белка, снижение количества ЩФ. Существенные отклонения от нормы показателей печеночных ферментов свидетельствуют о серьезных функциональных нарушениях в печени. Эти данные согласуются с результатами гистологических исследований, в которых были выявлены тяжелые патологические изменения в печени (обширные некрозы) мышей, инфицированных культурой штамма MA554.

Поскольку цель работы заключалась в разработке модели пищевой листериозной инфекции, пригодной для оценки *in vivo* эффективности антибактериальных препаратов, мы провели эксперименты по лечению листериоза у мышей, вызываемого штаммами ББ1 и MA554 *L. monocytogenes*. Кишечную листериозную инфекцию у мышей BALB/c с антибиотик-ассоциированным дисбиозом кишечника вызывали внутрижелудочным введением культур *L. monocytogenes* ББ1 и *L. monocytogenes* MA554 в дозе 10^8 КОЕ. Лечение экспериментальной листериозной инфекции начинали через 3 и 72 ч после заражения. В качестве антибактериальных препаратов использовали антибиотики, рекомендованные для лечения листериоза, – ко-тримоксазол, комбинация ампициллина с гентамицином [31, 32]. Курс терапии составил 5 дней. Результаты экспериментального лечения показали, что разработанные нами модели пищевой листериозной инфекции позволяют оценивать эффективность различных антибактериальных препаратов, определять их активность *in vivo* в зависимости от схемы лечения.

Ампициллин в сочетании с гентамицином давал лучший лечебный результат, чем ко-тримоксазол при лечении листериоза, обусловленного штаммом ББ1, причем этот эффект наблюдался как при раннем начале лечения (через 3 ч после заражения), так и при позднем (через 3 дня после заражения). Выживаемость мышей была на 40 и 10% соответственно выше, чем в контрольной группе (без лечения). При раннем начале лечения все выжившие животные в лечебных группах были санированы от листерий, тогда как при позднем начале лечения фекалии мышей оставались контаминированными клетками *L. monocytogenes* ББ1. Тем не менее уро-

вень обсемененности фекалий листериями был на 2–3 порядка ниже, чем в контроле. Ко-тримоксазол не повышал выживаемость мышей от кишечной листериозной инфекции при обоих схемах терапии. Тем не менее этот антибиотик снижал обсемененность фекалий мышей листериями на 2 порядка при позднем начале лечения и санировал кишечник при ранней терапии.

Экспериментальная пищевая инфекция, обусловленная внутрижелудочным введением 10^8 КОЕ *L. monocytogenes* MA554, вызывала гибель только 20% мышей BALB/c с индуцированным дисбиозом кишечника и стойкую колонизацию их кишечника. Лечение кишечного листериоза ко-тримоксазолом и комбинацией ампициллина с гентамицином, как и в случае со штаммом ББ1, дало положительный эффект. Раннее начало курса антибиотикотерапии приводило к максимальному результату: 100% животных выжили и излечились от листериоза. Введение мышам ко-тримоксазола при отложенном начале лечения лишь на 10% увеличивало количество выживших животных по сравнению с контролем. Назначение ампициллина с гентамицином не повышало выживаемость мышей. Кроме того, на 10-е сутки после заражения у всех животных из лечебных групп с поздним началом лечения в фекалиях имелись листерии, но их количество было на 1–1,5 порядка ниже, чем в контрольной группе мышей.

Таким образом, эксперименты по лечению пищевой листериозной инфекции у мышей линии BALB/c, обусловленной штаммами *L. monocytogenes* ББ1 и *L. monocytogenes* MA554, показали пригодность разработанных моделей для оценки эффективности антибактериальных препаратов.

Заключение

В ходе исследований разработаны две модели листериозной пищевой инфекции, обусловленные штаммами *L. monocytogenes* MA554 или *L. monocytogenes* ББ1. Кишечный листериоз индуцируют на мышах линии BALB/c с дисбиозом кишечника, заражая их культурами тест-штаммов внутрижелудочно в дозе 10^8 КОЕ. После заражения листерии длительное время (не менее 2 нед.) персистируют в кишечнике модельных животных. При этом уровень смертности среди инфицированных мышей может достигать 20–40%.

Характер развития экспериментального пищевого листериоза у мышей позволяет использовать разработанные нами модели для оценки эффективности антибактериальных препаратов. Основными критериями оценки активности препаратов и схем их применения являются показатели выживаемости инфицированных животных, содержание листерий в фекалиях модельных животных и их органах.

Результаты экспериментального лечения кишечной листериозной инфекции показали, что активные *in vitro* в отношении *L. monocytogenes* MA554 и *L. monocytogenes* ББ1 ко-тримоксазол и комбинация ампициллина с гентамицином оказывают хороший лечебный эффект при пятидневном курсе применения. Раннее начало антибиотикотерапии приводит к полной санации кишечника инфицированных животных, а также к снижению смертности среди мышей. Более позднее начало антибиотикотерапии дает меньший лечебный эффект: наблюдается снижение обсемененности фекалий

мышей клетками листерий. Полученные результаты свидетельствуют о том, что предложенные нами модели кишечной листериозной инфекции пригодны для оценки *in vivo* эффективности антибактериальных препаратов.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectoral program of Rosпотребнадзор

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Carpentier B, Cerf O. Reviewe persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. Int J Food Microbiol. 2011;145(1):1-8. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005
2. Orsi RH, Bakker HCD, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. Int J Med Microbiol. 2011;301(2):79-796. DOI: 10.1016/j.ijmm.2010.05.002
3. Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. Infect. 2007;9(10):1236-43. DOI: 10.1016/j.micinf. 2007.05.011
4. Бакулов ИА, Котляров ВМ, Шестиперова ТИ. Эпидемиологические и эпизоотологические аспекты листериоза. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1994;5:100-5.
5. Mead PS, Slutsker L, Dietz V. Food-related illness and death in the United States. Emerging Infect Dis. 1999;5:607-626. DOI: 10.3201/eid0505.990502
6. Lecuit M. Human listeriosis and animal models. Microbes Infect. 2007;9:1216-25. DOI: 10.1016/j.micinf.2007.05.009
7. Southwick FS, Purich DL. Intracellular pathogenesis of listeriosis. N Engl J Med. 1996;334(12):770-776. DOI: 10.1056/NEJM199603213341206
8. Doran KS, Banerjee A, Disson O, Lecuit M. Concepts and mechanisms: crossing host. Cold Spring Harbor Perspect. Med. 2013;3(7):a010090. DOI: 10.1101/cshperspect.a010090
9. Becattini S, Littmann ER, Carter RA. Commensal microbes provide first line defense against *Listeria monocytogenes* infection. J Exp Med. 2017;214(N):1973-89. DOI:10.1084/jem.20170495
10. Louria DB, Hensle T, Armstrong D, Collins HS. Listeriosis complicating malignant disease. A new association. Ann Intern Med. 1967;67(2):260-281. DOI: 10.7326/0003-4819-67-2-261
11. Jurado RL, Farley MM, Pereira E, Harvey RC. Increased risk of meningitis and bacteremia due to *Listeria monocytogenes* in patients with human immunodeficiency virus infection. Clin Infect Dis. 1993;17(2):224-227. DOI: 10.1093/clinids/17.2.224
12. Goulet V, Hedberg C, Le Monnier A, de Valk H. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. Emerg Infect Dis. 2008;14(5):734-740. DOI: 10.3201/eid1405.071395
13. Koch J, Stark K. Significant increase of listeriosis in Germany – epidemiological patterns 2001–2005. Euro Surveill. 2006;11(6):85-88.
14. Caballero S, Pamer EG. Microbiota-mediated inflammation and antimicrobial defense in the intestine. Annu Rev Immunol. 2015;33:227-256. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120238

15. Becattini S, Taur Y, Pamer EG. Antibiotic-Induced changes in the intestinal microbiota and disease. *Trends Mol Med.* 2016;22(6):458-78. DOI: 10.1016/j.molmed.2016.04.003
16. Schnupf P, Portnoy DA. Listeriolysin O: a phagosome-specific lysine. *Microbes Infect.* 2007;9(10):1176-87. DOI: 10.1016/j.micinf.2007.05.005
17. Zhu WM, Liu W, Wu DQ. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7. *J Appl Microbiol.* 2000;88:877-86. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.01027
18. Corr SC, Li Y, Riedel CU, O'Toole PW, Hill C, Gahan CG. Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc Natl Acad.* 2007;104(18):7617-21. DOI: 10.1073/pnas.0700440104
19. Delgado S, O'Sullivan E, Fitzgerald G, Mayo B. Subtractive screening for probiotic properties of *Lactobacillus* species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics. *J Food Sci.* 2007;72:M310-M315. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2007.00479.x
20. Travier L, Guadagnini S, Gouin E, Dufour A. Act A promotes *Listeria monocytogenes* aggregation, intestinal colonization and carriage. *PLoS Pathog.* 2013;9:e1003131.
21. Orsi RH, den Bakker HC, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol.* 2011 Feb;301(2):79-96. DOI: 10.1016/j.ijmm.2010.05.002
22. Smith GA, Marquis H, Jones S, Johnston NC, Portnoy DA, Goldfine H. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect Immun.* 1995;63(11):4231-4237. DOI: 10.1128/IAI.63.11.4231-4237.1995
23. De Almeida RN, Chesca AC, da Silva AD, Cecilia E. Antimicrobial sensitivity of *Listeria monocytogenes* isolated from beef. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal.* 2018;12(3). DOI: 10.5935/1981-2965.20180025
24. Noll M, Kleta S, Al Dahouk S. Antibiotic susceptibility of 259 *Listeria monocytogenes* strains isolated from food, food-processing plants and human samples in Germany. *J Infect Public Health.* 2018 Jul-Aug;11(4):572-577. DOI: 10.1016/j.jiph.2017.12.007
25. Conter M, Paludi D, Zanardi E, Ghidini S, Vergara A, Ianieri A. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 2009 Jan 15;128(3):497-500. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.018
26. Panera-Martínez S, Rodríguez-Melcon C, Serrano-Galan V, Alonso-Calleja C, Capita R. Prevalence, quantification and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* in poultry preparations. *Food Control.* 2022;135:108608. DOI: 10.1016/j.foodcont.2021.108608
27. Allerberger F, Wagner M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin Microbiol Infect.* 2010 Jan;16(1):16-23. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.03109.x
28. Davis JA, Jackson CR. Comparative antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, and *L. welshimeri*. *Microb Drug Resist.* 2009;15(1):27-32. DOI: 10.1089/mdr.2009.0863
29. Azimi PH, Koranyi K, Lindsey KD. *Listeria monocytogenes*: synergistic effects of ampicillin and gentamicin. *Am J Clin Pathol.* 1979;72:974-977. DOI: 10.1093/ajcp/72.6.974
30. Moellering Jr RC, Medoff G, Leech I. Antibiotic synergism against *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1972;1(1):30-34. DOI: 10.1128/aac.1.1.30
31. Методические рекомендации №11 от 2001 г. Листериоз: утверждены Председателем Комитета здравоохранения 04 апреля 2001 г.: разработаны инфекционной клинической больницей №1 Комитета здравоохранения, МГМСУ, ИПВИ им. М.П.Чумакова ПАМН.
32. Страчунский ЛС, Белоусова ЮБ, Козлова СН. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. Под ред. Страчунского Л.С.. НИИХ СГМА, 2002; 381 с.
33. Audurier A, Pardon P, Marly J, Lantier F. Experimental infection of mice with *L. monocytogenes* and *L. innocua*. *Ann Microbiol.* 1980;131B(1):47-57.
34. Golnazarian CA, Donnelly CW, Pintauro SJ, Howard DB. Comparison of infectious dose of *Listeria monocytogenes* F5817 as determined for normal versus compromised C57b1/6j mice. *J Food Prot.* 1989;52(10):696-701. DOI: 10.4315/0362-028X-52.10.696
35. Czuprynski CJ, Faith N.G., Steinberg H. A/J mice are susceptible and C57BL/6 mice are resistant to *Listeria monocytogenes* infection by intragastric inoculation. *Infect Immun.* 2003;71(2):682-689. DOI: 10.1128/IAI.71.2.682-689.2003
36. Bergmann S, Beard PM, Pasche B, Lienenklaus S, Weiss S, Gahan CG. Influence of internalin A murinisation on host resistance to orally acquired listeriosis in mice. *Microbiol.* 2013;13(90):2-16. DOI: 10.1186/1471-2180-13-90
37. Czuprynski CJ, Theisen C, Brown JF. Treatment with the antigranulocyte monoclonal antibody RB6-8C5 impairs resistance of mice to gastrointestinal infection with *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* 1996;64(9):3946-49. DOI: 10.1128/IAI.64.9.3946-3949.1996
38. Zachar Z, Savage DC. Microbial interference and colonization of the murine gastrointestinal tract by *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* 1979;23(1):168-74. DOI: 10.1128/IAI.23.1.168-174.1979
39. Suyemot MM, Hamrick TS, Spears PA. Extruterine Listeriosis in the Gravid Mouse Influences Embryonic Growth and Development. *PLoS ONE.* 2013;8(8):1-6. DOI: 10.1371/journal.pone.0072601
40. Schleich WF, Chase DP, Badley A. A model of food-borne *Listeria monocytogenes* infection in the Sprague-Dawley rat using gastric inoculation: development and effect of gastric acidity on infective dose. *Int J Food Microbiol.* 1993;18(1):15-24. DOI: 10.1016/0168-1605(93)90003-Y
41. Wadolkowski EA, Burris JA, O'Brien AD. Mouse model for colonization and disease caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun.* 1990 Aug;58(8):2438-45. DOI: 10.1128/iai.58.8.2438-2445.1990

References

1. Carpentier B, Cerf O. Reviewe persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int J Food Microbiol.* 2011;145(1):1-8. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005
2. Orsi RH, Bakker HCD, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol.* 2011;301(2):79-796. DOI: 10.1016/j.ijmm.2010.05.002
3. Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. *Infect.* 2007;9(10):1236-43. DOI: 10.1016/j.micinf.2007.05.011
4. Bakulov IA, Kotlyarov VM, Shestiperova TI. Epidemiological and epizootological aspects of listeriosis. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 1994;5:100-5. (In Russian).
5. Mead PS, Slutsker L, Dietz V. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infect Dis.* 1999;5:607-626. DOI: 10.3201/eid0505.990502
6. Lecuit M. Human listeriosis and animal models. *Microbes Infect.* 2007;9:1216-25. DOI: 10.1016/j.micinf.2007.05.009
7. Southwick FS, Purich DL. Intracellular pathogenesis of listeriosis. *N Engl J Med.* 1996;334(12):770-776. DOI: 10.1056/NEJM199603213341206
8. Doran KS, Banerjee A, Disson O, Lecuit M. Concepts and mechanisms: crossing host. *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* 2013;3(7):a010090. DOI: 10.1101/cshperspect.a010090
9. Becattini S, Littmann ER, Carter RA. Commensal microbes provide first line defense against *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med.* 2017;214(N):1973-89. DOI:10.1084/jem.20170495
10. Louria DB, Hensle T, Armstrong D, Collins HS. Listeriosis complicating malignant disease. A new association. *Ann Intern Med.* 1967;67(2):260-281. DOI: 10.7326/0003-4819-67-2-261
11. Jurado RL, Farley MM, Pereira E, Harvey RC. Increased risk of meningitis and bacteremia due to *Listeria monocytogenes* in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis.* 1993;17(2):224-227. DOI: 10.1093/clinids/17.2.224

12. Goulet V, Hedberg C, Le Monnier A, de Valk H. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(5):734-740. DOI: 10.3201/eid1405.071395
13. Koch J, Stark K. Significant increase of listeriosis in Germany – epidemiological patterns 2001–2005. *Euro Surveill*. 2006;11(6):85-88
14. Caballero S, Pamer EG. Microbiota-mediated inflammation and antimicrobial defense in the intestine. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:227-256. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120238
15. Becattini S, Taur Y, Pamer EG. Antibiotic-Induced changes in the intestinal microbiota and disease. *Trends Mol Med*. 2016;22(6):458-78. DOI: 10.1016/j.molmed.2016.04.003
16. Schnupf P, Portnoy DA. Listeriolysin O: a phagosome-specific lysine. *Microbes Infect*. 2007;9(10):1176-87. DOI: 10.1016/j.micinf. 2007.05.005
17. Zhu WM, Liu W, Wu DQ. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7. *J Appl Microbiol*. 2000;88:877-86. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.01027
18. Corr SC, Li Y, Riedel CU, O'Toole PW, Hill C, Gahan CG. Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc Natl Acad*. 2007;104(18):7617-21. DOI: 10.1073/pnas.0700440104.
19. Delgado S, O'Sullivan E, Fitzgerald G, Mayo B. Subtractive screening for probiotic properties of *Lactobacillus* species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics. *J Food Sci*. 2007;72:M310-M315. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2007.00479.x
20. Travier L, Guadagnini S, Gouin E, Dufour A. Act A promotes *Listeria monocytogenes* aggregation, intestinal colonization and carriage. *PLoS Pathog*. 2013;9:e1003131.
21. Orsi RH, den Bakker HC, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol*. 2011 Feb;301(2):79-96. DOI: 10.1016/j.ijmm.2010.05.002
22. Smith GA, Marquis H, Jones S, Johnston NC, Portnoy DA, Goldfine H. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect Immun*. 1995;63(11):4231-4237. DOI: 10.1128/IAI.63.11.4231-4237.1995
23. De Almeida RN, Chesca AC, da Silva AD, Cecilia E. Antimicrobial sensitivity of *Listeria monocytogenes* isolated from beef. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. 2018;12(3). DOI: 10.5935/1981-2965.20180025
24. Noll M, Kleta S, Al Dahouk S. Antibiotic susceptibility of 259 *Listeria monocytogenes* strains isolated from food, food-processing plants and human samples in Germany. *J Infect Public Health*. 2018 Jul-Aug;11(4):572-577. DOI: 10.1016/j.jiph.2017.12.007
25. Conter M, Paludi D, Zanardi E, Ghidini S, Vergara A, Ianieri A. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol*. 2009 Jan 15;128(3):497-500. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.018
26. Panera-Martínez S, Rodríguez-Melcon C, Serrano-Galan V, Alonso-Calleja C, Capita R. Prevalence, quantification and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* in poultry preparations. *Food Control*. 2022;135:108608. DOI: 10.1016/j.foodcont.2021.108608
27. Allerberger F, Wagner M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin Microbiol Infect*. 2010 Jan;16(1):16-23. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.03109.x
28. Davis JA, Jackson CR. Comparative antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, and *L. welshimeri*. *Microb Drug Resist*. 2009;15(1):27-32. DOI: 10.1089/mdr.2009.0863
29. Azimi PH, Koranyi K, Lindsey KD. *Listeria monocytogenes*: synergistic effects of ampicillin and gentamicin. *Am J Clin Pathol*. 1979;72:974-977. DOI: 10.1093/ajcp/72.6.974
30. Moellering Jr RC, Medoff G, Leech I. Antibiotic synergism against *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1972;1(1):30-34. DOI: 10.1128/aac.1.1.30
31. Methodological Recommendations No 11 of 2001 Listeriosis: approved by the Chairman of the Health Committee on April 04, 2001: developed by the Infectious Clinical Hospital No 1 of the Health Committee, MGMSU, IPVI named after M.P.Chumakov RAMS.
32. Strachunsky LS, Belousova YuB, Kozlova SN. Practical guide to anti-infective chemotherapy. Edited by LS Strachunsky. NIIAH SGMA, 2002; 381 p. (In Russian).
33. Audurier A, Pardon P, Marly J, Lantier F. Experimental infection of mice with *L. monocytogenes* and *L. innocua*. *Ann Microbiol*. 1980;131B(1):47-57.
34. Golnazarian CA, Donnelly CW, Pintauro SJ, Howard DB. Comparison of infectious dose of *Listeria monocytogenes* F5817 as determined for normal versus compromised C57b1/6j mice. *J Food Prot*. 1989;52(10):696-701. DOI: 10.4315/0362-028X-52.10.696
35. Czuprynski CJ, Faith N.G., Steinberg H. A/J mice are susceptible and C57BL/6 mice are resistant to *Listeria monocytogenes* infection by intragastric inoculation. *Infect Immun*. 2003;71(2):682-689. DOI: 10.1128/IAI.71.2.682-689.2003
36. Bergmann S, Beard PM, Pasche B, Lienenklaus S, Weiss S, Gahan CG. Influence of internalin A murinisation on host resistance to orally acquired listeriosis in mice. *Microbiol*. 2013;13(90):2-16. DOI: 10.1186/1471-2180-13-90
37. Czuprynski CJ, Theisen C, Brown JF. Treatment with the antigranulocyte monoclonal antibody RB6-8C5 impairs resistance of mice to gastrointestinal infection with *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*. 1996;64(9):3946-49. DOI: 10.1128/IAI.64.9.3946-3949.1996
38. Zachar Z, Savage DC. Microbial interference and colonization of the murine gastrointestinal tract by *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*. 1979;23(1):168-74. DOI: 10.1128/IAI.23.1.168-174.1979
39. Suyemot MM, Hamrick TS, Spears PA. Extruterine Listeriosis in the Gravid Mouse Influences Embryonic Growth and Development. *PLoS ONE*. 2013;8(8):1-6. DOI: 10.1371/journal.pone.0072601
40. Schlech WF, Chase DP, and Badley A. A model of food-borne *Listeria monocytogenes* infection in the Sprague-Dawley rat using gastric inoculation: development and effect of gastric acidity on infective dose. *Int J Food Microbiol*. 1993;18(1):15-24. DOI: 10.1016/0168-1605(93)90003-Y
41. Wadolkowski EA, Burris JA, O'Brien AD. Mouse model for colonization and disease caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*. 1990 Aug;58(8):2438-45. DOI: 10.1128/iai.58.8.2438-2445.1990

Информация о соавторах:

Коробова Ольга Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Комбарова Татьяна Ивановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Перескокова Евгения Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Ганина Елена Анатольевна, научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Olga V. Korobova, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher of the Biological Testing Laboratory, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Tatiana I. Kombarova, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher of the Biological Testing Laboratory, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Evgenia S. Pereskokova, Junior Researcher of the Biological Testing Laboratory, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Elena A. Ganina, Researcher of the Biological Testing Laboratory, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Определение бактерий туляремии в образцах окружающей среды с помощью сочетания иммуномагнитной сепарации и изотермической амплификации

А.Г.Шевяков, И.В.Щит, С.С.Ветчинин, Р.И.Миронова, С.Г.Игнатов, С.Ф.Бикетов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболensk, Московская область, Российская Федерация

В работе исследуется возможность сочетания методов иммуномагнитной сепарации и изотермической амплификации при детекции возбудителя туляремии, *Francisella tularensis*, в образцах из окружающей среды. Подобраны оптимальные условия сепарации клеток с помощью иммуномагнитных частиц, обеспечивающие экспрессность диагностики. Для детекции туляремийных клеток применяли изотермическую амплификацию с визуализацией результата с помощью флуоресцентного интеркалирующего красителя. Предложенное сочетание методов позволяет проводить ускоренную диагностику *F. tularensis* в условиях ограниченных ресурсов.

Ключевые слова: иммуномагнитные частицы, иммуномагнитная сепарация, изотермическая амплификация

Для цитирования: Шевяков А.Г., Щит И.В., Ветчинин С.С., Миронова Р.И., Игнатов С.Г., Бикетов С.Ф. Определение бактерий туляремии в образцах окружающей среды с помощью сочетания иммуномагнитной сепарации и изотермической амплификации. Бактериология. 2022; 7(4): 57–60. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-57-60

Detection of tularemia bacteria in environmental samples using a combination of immunomagnetic separation and isothermal amplification

A.G.Shevyakov, I.Yu.Shchit, S.S.Vetchinin, R.I.Mironova, S.G.Ignatov, S.F.Biketov

State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

The possibility of combining the methods of immunomagnetic separation and isothermal amplification when detecting the causative agent of tularemia *Francisella tularensis* in environmental samples was studied in this work. Optimal conditions for cell separation with the help of immunomagnetic particles were selected to rapid diagnostics. Isothermal amplification was used for the detection of tularemia cells with visualization of the result using a fluorescent intercalating dye. The proposed combination of methods allows rapid diagnosis of *F. tularensis* under resource-limited conditions.

Key words: immunomagnetic particles, immunomagnetic separation, isothermal amplification

For citation: Shevyakov A.G., Shchit I.Yu., Vetchinin S.S., Mironova R.I., Ignatov S.G., Biketov S.F. Detection of tularemia bacteria in environmental samples using a combination of immunomagnetic separation and isothermal amplification. Bacteriology. 2022; 7(4): 57–60. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-57-60

Для корреспонденции:

Шевяков Антон Георгиевич, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболensk, Территория «Квартал А», 26
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: shevyakov@obolensk.org

Статья поступила 17.11.2022 г., принята к печати 28.12.2022 г.

For correspondence:

Anton G. Shevyakov, Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 26 «Quarter A» Territory, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: shevyakov@obolensk.org

The article was received 17.11.2022, accepted for publication 28.12.2022

Туляремия – зоонозная природно-очаговая особо опасная инфекция, вызываемая грамотрицательной бактерией *Francisella tularensis*. В водной среде бактерии туляремии способны выживать длительное время при температуре +4°C. Для обнаружения и идентификации *F. tularensis* применяются различные методы – биосенсоры, культивирование на селективных питательных средах, иммунохроматографический анализ, полимеразная цепная реакция (ПЦР), биочипы на жидкой или твердой основе, методы аналитической химии (газовая хроматография, масс-спектрометрия и т.д.). Наиболее часто применяемым методом обнаружения *F. tularensis* является ПЦР [1]. В настоящее время в молекулярной диагностике активно внедряются методы изотермической амплификации. Среди таких методов – loop-mediated isothermal amplification (LAMP), показавший высокую специфичность и амплификационную эффективность, которая достигается при изотермальных условиях реакции [2]. Амплификацию и детектирование гена можно осуществить за одну стадию путем инкубации смеси образцов, праймеров, ДНК-полимеразы с функцией вытеснения цепей и субстратов при постоянной температуре (около 65°C). Эффективность амплификации очень высока – в течение 15–60 мин ДНК амплифицируется 10^9 – 10^{10} раз. Из-за высокой специфичности присутствие амплифицированного продукта однозначно указывает на присутствие гена-мишени. Известно об использовании методов изотермической амплификации для выявления *F. tularensis* [3]. Основной сложностью при их использовании являются неспецифические реакции при анализе близкородственных штаммов. Эта проблема может быть решена при использовании иммуномагнитных частиц на основе высокоспецифичных моноклональных антител (МКАт).

Целью данной работы было исследование возможности сочетания методов иммуномагнитной сепарации и изотермической амплификации при детекции *F. tularensis*.

Материалы и методы

Бактериальные клетки

Вакцинный штамм *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15/10 НИИЭГ был получен из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск, Московская область).

Условия культивирования

Культуры микроорганизмов выращивали при температуре 37°C на плотной питательной среде состава: эритрит-агар – 3,8%, высушенная кровь крупного рогатого скота – 1%, глюкоза – 1%, цистеин – 0,05%, тиамин хлорид – 0,0025%, pH 7,2 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Московская обл.). Стандартные суспензии клеток 5×10^9 КОЕ/мл штамма *F. tularensis* 15/10 НИИЭГ готовили в забуференном физиологическом растворе (0,15 М натрия хлористого и 0,015 М калий-натриевого фосфатного буфера, pH 7,4) с использованием стандарта мутности (ОСО 42-28-85-2012, НЦЭСМП). Обеззараживание микробных клеток проводили прогреванием бактериальных суспензий на кипящей водяной бане в течение 30 мин.

Наработка моноклональных антител к возбудителю туляремии

Для наработки МКАт к липополисахариду *F. tularensis* гибридому 3F5 [4] выращивали *in vitro* в культуральных флаконах T-75 (TPP, Швейцария) на среде RPMI-1640 (Gibco, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США) при температуре 37°C и 5% CO₂. После 4–6 суток роста культуральную жидкость с клетками гибридом центрифугировали при 500 g в течение 5 мин, осевшие клетки ресуспендировали в стерильном 0,9%-м растворе хлорида натрия до концентрации 10^6 клеток/мл и вводили по 1,0 мл внутрибрюшинно мышам линии BALB/c. Мышам за 21 сутки внутрибрюшинно вводили 0,5 мл пристана (Sigma-Aldrich, США). Через 7–10 суток после инъекции суспензии гибридом у мышей собирали асцитную жидкость, содержащую МКАт. Клетки из асцитной жидкости удаляли центрифугированием при 1000 g в течение 15 мин. Супернатант смешивали в соотношении 1:4 с 0,1 М фосфатным буферным раствором (ФБ) pH 8,6, фильтровали через полиэфирсульфоновый фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (TPP, Швейцария). Очистку МКАт проводили с помощью аффинной хроматографии на хроматографической колонке с белок-A сефарозой MabSelectA (Cytiva, США). Колонку предварительно уравнивали ФБ, затем пропускали разведение асцита со скоростью 0,5 мл/мин. Связавшиеся иммуноглобулины элюировали 0,1 М натрий-цитратным буферным раствором pH 3,0 и гель-фильтрационной хроматографией на колонке с сефадекс G-25 (Cytiva, США) переводили в фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ) pH 7,4. Концентрацию полученных иммуноглобулинов определяли на спектрофотометре DS-11 (DeNovix, США).

Получение иммуномагнитных частиц (ИМЧ)

Для получения ИМЧ с МКАт 3F5 использовали карбоксилированные магнитные частицы (MagSphere, США). Карбоксильные группы активировали карбодиимидным методом с использованием 10 мМ 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида и 20 мМ N-гидроксисукцинимид (Sigma, США) в 0,1 М морфолиноэтансульфоновом буферном растворе pH 5,0 с 0,05% Tween-20 (MEST). Активацию магнитных частиц проводили при комнатной температуре с постоянным перемешиванием в течение 40 мин. После промывки на магнитном штативе к частицам добавляли раствор МКАт 3F5 в MEST. Конъюгирование проводили в течение 90 мин при по-

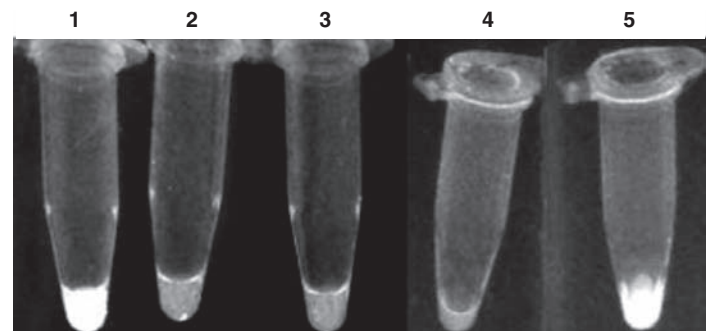


Рис. 1. Результат изотермической амплификации образцов после иммуномагнитной сепарации: 1 – 10^3 м.к. *F. tularensis*, 2 – 10^2 м.к. *F. tularensis*, 3 – 10^1 м.к. *F. tularensis*, 4 – отрицательный контроль (вода), 5 – положительный контроль (100 пг/мл ДНК *F. tularensis*).

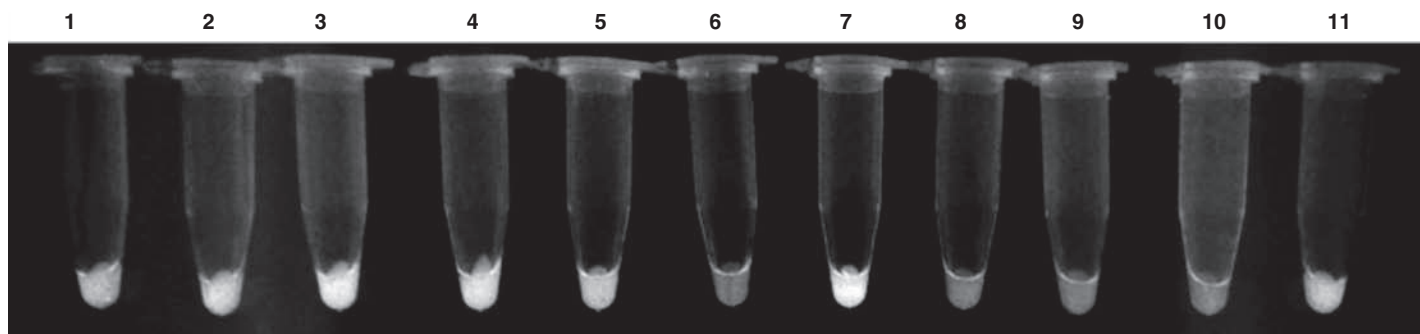


Рис. 2. Результат изотермической амплификации 10^3 м.к. *F. tularensis* в образце после иммуномагнитной сепарации: 1–3 – время иммуномагнитной сепарации 60 мин, 4–6 – 40 мин, 7–9 – 20 мин, 10 – отрицательный контроль (вода), 11 – положительный контроль (100 пг/мкл ДНК *F. tularensis*).

стоянном перемешивании. Оставшиеся реакционноспособные группы частиц инактивировали добавлением 1%-го раствора альбумина. Готовую суспензию ИМЧ промывали и переводили в ФСБ с 0,1% Triton X-100 и 0,01% азида натрия.

Иммуномагнитная сепарация

В образцы воды из природного водоема объемом 10 мл добавляли клетки *F. tularensis* в количестве от 10^6 до 10^1 микробных клеток. Приготовленные образцы фильтровали через фильтровальную бумагу и доводили рН до нейтрального добавлением 10× концентрата ФСБ. К полученным фильтратам добавляли по 50 мкл 0,25%-й суспензии ИМЧ и инкубировали с перемешиванием в течение 60 мин. Далее частицы осаждали в магнитном штативе и трижды промывали ФСБТ с осаждением на магнитном штативе. После промывки частицы ресуспендировали в 50 мкл лизирующего буферного раствора для выделения ДНК «РибоСОРБ» («Амплисенс», Россия). Для определения оптимального времени иммуномагнитной сепарации ИМЧ инкубировали с образцами в течение 60, 40 и 20 мин.

Изотермическая амплификация

Для постановки изотермической амплификации использовали набор праймеров аспFt101 [5]. Реакция LAMP проводилась в объеме 25 мкл с использованием по 0,2 μ M праймеров аспFt101-F3 и аспFt101-B3, по 1,6 μ M праймеров аспFt101-FIP и аспFt101-BIP («Синтол», Россия), 2,5 мкл 10× буферного раствора для LAMP («РусЭнзим», Россия), 1,4 мМ дНТФ («Ероген», Россия), 0,8 М бетаина (Sigma-Aldrich, США), 8 IU полимеразы Bst (NEB, США) и 5 мкл образца ДНК *F. tularensis* после иммуномагнитной сепарации. Стерильной деионизованной водой доводили объем до 25 мкл. В качестве отрицательного контроля использовали воду для инъекций, для положительного контроля – ДНК, выделенную из штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15/10 НИИЭГ. Реакция проводилась при 63°C 45 мин и останавливалась прогревом до 80°C 2 мин. Нагрев проводили в твердотельном термостате «Гном» («ДНК-технологии», Россия).

Анализ продуктов реакции LAMP

Ампликоны LAMP определяли визуально по свечению интеркалирующего красителя SYTO 82 (Invitrogen, США) при УФ-облучении в трансиллюминаторе (Vilber Lourmat, Франция). О положительной реакции судили по появлению интенсивного желто-зеленого свечения.

Результаты и обсуждение

Из рис. 1 видно, что предел чувствительности метода ИМС-LAMP составил 10^3 микробных клеток *F. tularensis* при длительности иммуномагнитной сепарации 60 мин.

Уменьшение времени инкубирования образцов с ИМЧ показало, что вероятность положительного результата амплификации снижается (рис. 2). При инкубации в течение 40 мин вероятность обнаружения *F. tularensis* составила 66%, а при инкубации в течение 20 мин – 33%.

Заключение

Проведенное исследование продемонстрировало возможность сочетанного использования иммуномагнитной сепарации и изотермической амплификации для детекции *F. tularensis* в образцах воды из природного водоема. Предложенная методика позволяет провести анализ в течение 3 ч с момента отбора пробы. Полученные результаты открывают перспективы внедрения данной методики для детекции *F. tularensis* в природных образцах другого происхождения. Исследованная методика не требует высококвалифицированного персонала и сложного, дорогостоящего оборудования.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectoral program of Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J Biochem Biophys Methods*. 2007 Apr 10;70(3):499-501. DOI: 10.1016/j.jbbm.2006.08.008
2. Vetchinin SS, Shevyakov AG, Khomyakov AE, Mironova RI, Mokrievich AN, Biketov SF. Development of an Immunoassay Test System Based on Monoclonal

Antybodies and Immunomagnetic Particles for the Detection of *F. tularensis* Cells. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2021;66(6):353-57. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-6-353-357.

- Zasada AA, Zacharczuk K, Formińska K, Wiatrzyk A, Ziolkowski R, Malinowska E. Isothermal DNA amplification combined with lateral flow dipsticks for detection of biothreat agents. Anal Biochem. 2018 Nov 1;560:60-66. DOI: 10.1016/j.ab.2018.09.008
- Tatarnikov SA, Mazepa AV, Balakhonov SV. Оптимизация Nested-варианта полимеразной цепной реакции для мониторинга природных очагов туляремии. Инфекция и иммунитет. 2013;3(2):175.
- Щит ИЮ, Бикетов СФ, Дятлов ИА. Набор олигонуклеотидных праймеров Ft101 и способ определения бактерий *Francisella tularensis* (варианты). Патент RU 2703803 C1. Россия, 2019.

References

- Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. J Biochem Biophys Methods. 2007 Apr 10;70(3):499-501. DOI: 10.1016/j.jbbm.2006.08.008
- Vetchinin SS, Shevyakov AG, Khomyakov AE, Mironova RI, Mokrievich AN, Biketov SF. Development of an Immunoassay Test System Based on Monoclonal Antibodies and Immunomagnetic Particles for the Detection of *F. tularensis* Cells. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2021;66(6):353-57. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-6-353-357.
- Zasada AA, Zacharczuk K, Formińska K, Wiatrzyk A, Ziolkowski R, Malinowska E. Isothermal DNA amplification combined with lateral flow dipsticks for detection of biothreat agents. Anal Biochem. 2018 Nov 1;560:60-66. DOI: 10.1016/j.ab.2018.09.008
- Tatarnikov SA, Mazepa AV, Balakhonov SV. Optimization of the Nested variant of polymerase chain Reaction for monitoring natural foci of tularemia. Russian Journal of Infection and Immunity. 2013;3(2):175. (In Russian).
- Shchit IYu, Biketov SF, Dyatlov IA. A set of Ft101 oligonucleotide primers and a method for determining *Francisella tularensis* bacteria (variants). Patent RU 2703803 C1. Russia, 2019. (In Russian).

Информация о соавторах:

Щит Ирина Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Ветчинин Сергей Сергеевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Миронова Раиса Ивановна, научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Игнатов Сергей Георгиевич, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Бикетов Сергей Фёдорович, кандидат биологических наук, главный научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Irina Yu. Shchit, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Sergey S. Vetchinin, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher of Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Raisa I. Mironova, Researcher, Senior Researcher, Laboratory of Microbiology of Anthrax, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Sergey G. Ignatov, PhD, DSc (Biological Sciences), Chief Researcher, Laboratory of Nanobiotechnology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Sergey F. Biketov, PhD (Biological Science), Leading Researcher of Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор
E-mail: biketov@obolensk.org

НОВЫЕ КНИГИ

Эпидемиология: учебник для мед.-проф. факультетов / под ред. Л. П. Зуевой. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2022. – 400 с.

В учебнике представлено современное изложение эпидемиологии как науки, изучающей закономерности возникновения и распространения любых патологических состояний среди людей и разрабатывающей меры борьбы с заболеваниями.

Особое внимание уделено популяционным эпидемиологическим методам, используемым для выявления причин возникновения и распространения инфекционных и неинфекционных заболеваний. Подробно рассмотрены последние методические приемы эпидемиологии (эпидемиологической диагностики), включая их практическую реализацию.

Впервые дана подробная характеристика системы эпидемиологического надзора за всеми группами заболеваний.

Учебник написан в соответствии с программой по эпидемиологии, утвержденной Минздравом России, и предназначен студентам медико-профилактических факультетов медицинских вузов.



Опыт применения отечественных питательных сред при выделении сальмонелл из кормов и биологического материала животных

А.А.Кремлева¹, О.В.Полосенко², Л.В.Домотенко²

¹ФГБУ ВНИИЗЖ «Федеральный центр охраны здоровья животных», Москва, Российская Федерация;

²ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

При исследовании кормов и биологического материала животных на наличие бактерий рода *Salmonella* действующими нормативными документами Российской Федерации определен ряд питательных сред.

Проведены исследования по обнаружению и выделению сальмонелл из кормов для животных, а также из патологического и биологического материала животных на основании сравнительного анализа рекомендованных питательных сред (агар Эндо-ГРМ, агар МакКонки-ГРМ, агар Плоскирева-ГРМ, висмут-сульфит-ГРМ-агар) и новой питательной среды – Гектоенагар. Из 240 проанализированных образцов с применением всех используемых питательных сред было выделено 36 изолятов сальмонелл с последующим установлением их видовой принадлежности.

На основании сравнительного анализа всех питательных сред, предназначенных для выделения сальмонелл, доказано, что Гектоенагар не только обладает улучшенными дифференцирующими свойствами, что позволило легко определить состав микробных ассоциаций, но и селективными свойствами за счет включения в состав ингибиторов, подавляющих рост большинства сопутствующих микроорганизмов.

Обоснованное применение отечественной питательной среды Гектоенагар позволит в полном объеме удовлетворить потребности лабораторий ветеринарной микробиологии в качественных питательных средах, гарантирующих качество и стабильность при выделении сальмонелл из исследуемого материала.

Ключевые слова: *Salmonella*, исследование кормов и биологического материала животных, Гектоенагар

Для цитирования: Кремлева А.А., Полосенко О.В., Домотенко Л.В. Опыт применения отечественных питательных сред при выделении сальмонелл из кормов и биологического материала животных. Бактериология. 2022; 7(4): 61–65. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-61-65

Experience of using domestic nutrient media to isolate salmonella from animal feed and biological material

A.A.Kremleva¹, O.V.Polosenko², L.V.Domotenko²

¹Federal Center for Animal Health, Moscow, Russian Federation;

²State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Studying animal feed and biological materials for *Salmonella* bacteria has determined a number of appropriate nutrient media according to some regulatory documents of the Russian Federation.

Studies have been conducted to identify and isolate *Salmonella* from animal feed, as well as from pathological and biological animal samples by comparing the following recommended nutrient media: Endo-FMH (Fish Meal Hydrolysate) agar, McConkey-FMH agar, Ploskirev-FMH agar, Bismuth-sulfite-FMH-agar, and a new domestic nutrient medium Hectoenagar. Of 240 samples analyzed by using the media 36 salmonella isolates were obtained followed by their species identification.

The comparative analysis of the media to isolate *Salmonella* has showed that the Hectoenagar medium not only possesses improved differentiating properties allowing easy identification of the composition of microbial associations, but also has selective properties due to introduced inhibitors suppressing the growth of most concomitant microorganisms.

The reasonable application of the medium Hectoenagar will fully satisfy the need of veterinary microbiology laboratories for high-quality nutrient media assuring the quality and stability of *Salmonella* isolation from test materials.

Key words: *Salmonella*, study of animal feed and biological material, Hektoenagar

For citation: Kremleva A.A., Polosenko O.V., Domotenko L.V. Experience of using domestic nutrient media to isolate salmonella from animal feed and biological material. Bacteriology. 2022; 7(4): 61–65. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-61-65

Для корреспонденции:

Полосенко Ольга Вадимовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник сектора микробиологических исследований ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 26
Телефон: (4967) 312-170
E-mail: polosenko@obolensk.org

Статья поступила 17.11.2022 г., принята к печати 28.12.2022 г.

For correspondence:

Olga V. Polosenko, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher, Microbiology Research Unit, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 26 Territory «Quarter A», Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 312-170
E-mail: polosenko@obolensk.org

The article was received 17.11.2022, accepted for publication 28.12.2022

Система контроля качества и безопасности сырья и продуктов животного происхождения предусматривает комплексный контроль по всей технологической цепочке непосредственно от животных до готовой продукции. Особого внимания требуют те случаи, когда внешне клинически здоровые животные являются носителями опасных для здоровья человека возбудителей инфекционных и инвазионных заболеваний.

Современный уровень требований к качеству и безопасности продуктов пищевой, кормовой промышленности, экологическому состоянию окружающей среды выдвигает необходимость создания быстрых и надежных методов обнаружения в них патогенных бактерий, в частности бактерий рода *Salmonella* [1].

Сальмонеллы в настоящее время признаны индикаторными для всей группы патогенных кишечных бактерий. Сальмонеллез является одним из наиболее часто регистрируемых заболеваний пищевого происхождения во всем мире. Возникновение и распространение устойчивых форм патогенных бактерий – глобальная проблема ветеринарии и общественного здравоохранения.

Поскольку сальмонеллез и сейчас является одной из самых распространенных инфекций, актуальным является ускоренное выделение патогенов из объектов, представляющих биологическую опасность.

Учитывая полиморфизм клинических проявлений сальмонеллезом, лабораторные исследования с применением бактериологических и серологических методов являются важным звеном в диагностике [2].

Все более широкое применение в практике лабораторий находит использование современных иммунологических, молекулярно-генетических и других методов. Но, несмотря на достигнутые успехи, не все лаборатории, занятые в сфере анализа продовольственного сырья и кормов, а также биологического материала, имеют возможность использовать в своей практике дорогостоящие методы анализа (полимеразная цепная реакция, масс-спектрометрия и др.). Поэтому доступный культуральный метод до сих пор остается востребованным и актуальным в ветеринарии при выделении сальмонелл. Кроме того, перед современной наукой стоит задача оснастить специалистов, занятых в области обеспечения безопасности сырья животного происхождения и кормов, современными питательными средами с улучшенными ростовыми и дифференциально-диагностическими свойствами [3–6].

Эффективность проводимого исследования, направленного на выделение сальмонелл из разных материалов, в первую очередь зависит от применения качественных сред обогащения и адекватных дифференциально-диагностических сред.

Санитарно-микробиологическое исследование кормов для животных должно включать оптимальный набор питательных сред для выявления степени недоброкачественности продуктов, оказывающих непосредственное влияние на здоровье населения. Правила бактериологического исследования кормов на наличие сальмонелл регламентируют использование питательных сред: среды Плоскирева, Левина, висмут-сульфит-агара [7]. При лабораторной диагностике сальмонеллезом, а также обнаружении сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды ис-

пользуются: агар Эндо, агар Сальмонелла-Шигелла (SS-агар), ксилозо-лизин-деоксихолат-агар, бриллиант-грюн-агар, агар Мак-Конки [8].

Международными стандартами для выделения сальмонелл и шигелл из клинического материала рекомендуется селективная питательная среда Гектоенагар, обладающая четкими дифференцирующими свойствами, но не используемая в России из-за ее отсутствия. По этой же причине среда не используется и в ветеринарии.

Разработка и применение современных методов и средств диагностики инфекционных болезней животных, мониторинг ситуации с распространением возбудителей, в том числе бактерий рода *Salmonella*, является актуальной задачей всех филиалов Федерального центра охраны здоровья животных (ВНИИЗЖ). Поэтому **целью работы** явилась оценка современной ситуации по наличию сальмонелл в кормах для животных и в биологическом животном материале на основании сравнительного анализа ряда питательных сред.

Материалы и методы

На базе микробиологической лаборатории в ИЦНМВЛ ФГБУ ВНИИЗЖ г. Москва совместно с сотрудниками ФБУН ГНЦ ПМБ проведены исследования по определению степени контаминации и видового состава сальмонелл из кормов для животных и биологического материала с использованием набора современных питательных сред.

Было исследовано 240 образцов: корма для животных ($n = 140$), патологический материал ($n = 15$) и биологический материал ($n = 85$). В работе были использованы отечественные питательные среды:

накопительные – питательная среда для неселективного накопления бактерий (забуференная пептонная вода); питательная среда для накопления сальмонелл (селенитовый бульон); среда Мюллера–Кауфмана, питательный бульон для накопления сальмонелл по Раппапорту–Вассилиадису (RVS-бульон);

дифференциально-диагностические – питательная среда для обнаружения и выделения колиформных бактерий и кишечных патогенов (агар МакКонки-ГРМ); питательная среда для выделения сальмонелл (висмут-сульфит-ГРМ-агар); питательная среда для выделения шигелл и сальмонелл (агар Плоскирева-ГРМ); питательная среда для выделения энтеробактерий (агар Эндо-ГРМ); дифференциально-селективная питательная среда для выделения шигелл и сальмонелл (Гектоенагар).

Приготовление сред проводилось в строгом соответствии с инструкцией по применению. Посев материала осуществлялся на среды одного дня приготовления с соблюдением условия равнозначности.

Ростовые свойства оценивались по наличию выросших колоний типичной для сальмонелл морфологии. Дифференцирующие свойства – по характеру роста штаммов энтеробактерий, ферментирующих и неферментирующих лактозу, продуцирующих и не продуцирующих сероводород. Ингибирующие свойства – по наличию выросших колоний нетипичной для энтеробактерий морфологии.

«Правила бактериологического исследования кормов» использовались при исследовании кормов для животных [7].

При выделении сальмонелл из биологического и патологического материала руководствовались МУ 4.2.2723-10 «Лабораторная диагностика сальмонеллезов, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды» [8].

Биохимическую типизацию выделенных изолятов проводили с применением среды Клиггера-ГРМ и с помощью стрипов API 20E.

Для идентификации выросших колоний использовали метод времяпролетной MALDI-TOF масс-спектрометрии с помощью программного обеспечения FlexControl (Bruker Daltonik, Германия).

Серологическую группу выделенных культур сальмонелл определяли в реакции агглютинации (РА) сыворотками диагностическими адсорбированными для РА ПЕТСАЛ® производства ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов». Серологический вариант штамма определяли в соответствии со схемой Кауфмана–Уайта.

Результаты и обсуждение

При исследовании образцов кормов использовали метод предварительного обогащения, традиционно используемый при исследовании пищевых продуктов на наличие сальмонелл. Для этого навеску корма 25 г вносили в 225 мл буферной пептонной воды. Спустя 18–24 ч инкубации при 37°C по 1,0 мл культуральной жидкости вносили в 9 мл бульона Мюллера–Кауфмана и селенитового бульона.

Образцы биологического материала (фекалии сельскохозяйственных животных и помет птиц) после суспендирования (1 г в 10 мл 0,85%-го физиологического раствора) пересевали в количестве 1,0 мл в накопительные питательные среды: селенитовый бульон и RVS-бульон.

Для выделения возбудителя сальмонеллеза птиц отбирали кусочки паренхиматозных органов, гомогенизировали в 0,85%-м физиологическом растворе, затем также проводили пересев в среды накопления: селенитовый и RVS-бульон.

По истечении срока накопления образцов во всех жидких селективных средах (24 ч при 37°C и 41,5°C для RVS-бульона) во всех посевах образцов визуально наблюдался рост в виде диффузного помутнения с обесцвечиванием среды или без него. После накопления в селективных бульонах выявление сальмонелл упрощается, поскольку сопутствующая микрофлора после культивирования в таких средах в значительной степени подавлена. Из всех пробирок бактериологической петлей проводились штриховые пересевы на плотные дифференциально-диагностические питательные среды: агар МакКонки-ГРМ, висмут-сульфит-ГРМ-агар, агар Плоскирева-ГРМ, агар Эндо-ГРМ и Гектоенагар.

Учет результатов проводили через 18–20 ч инкубации, отмечая наличие дифференциации лактозоотрицательных сальмонелл от лактозоположительных штаммов эшерихий на средах агар МакКонки-ГРМ, Плоскирева-ГРМ и Эндо-ГРМ и по сероводородпродуцирующему признаку на висмут-сульфит-ГРМ-агаре и Гектоенагаре. Окончательный учет результатов для висмут-сульфит-ГРМ-агара проводили через 48 ч.

Через 18 и 48 ч инкубации посевов на плотных дифференциально-диагностических средах учитывали рост колоний с характерной для искомым микроорганизмов морфологией:

- круглые, прозрачные бесцветные или слегка розового цвета, со слабо выраженным центром колонии (лактозоотрицательные) на агаре Эндо-ГРМ,
- круглые бесцветные или слегка розового цвета, нежные, гладкие (лактозоотрицательные) на агаре Плоскирева-ГРМ,
- гладкие, бесцветные или бледно-розовые колонии (лактозоотрицательные) на агаре МакКонки-ГРМ,
- круглые или полиморфные, черные или темно-зеленые колонии, с металлическим блеском и окрашиванием среды под колониями в черный цвет (сероводородположительные) на висмут-сульфит-ГРМ-агаре,
- зеленовато-голубые колонии с черным центром (сероводородположительные) на Гектоенагаре.

Корма. После накопления в селенитовом бульоне и бульоне Мюллера–Кауфмана и пересева на все питательные дифференциально-диагностические среды было обнаружено 32 образца, обсемененных лактозоотрицательными и сероводородположительными микроорганизмами.

Патологический материал. После пересева с селективных сред накопления (селенитовый бульон и бульон RVS) на дифференциально-диагностических средах (агар МакКонки-ГРМ, агар Плоскирева-ГРМ, агар Эндо-ГРМ, а также висмут-сульфит-ГРМ-агар и Гектоенагар) было выявлено 11 образцов, обсемененных лактозоотрицательными и сероводородположительными микроорганизмами.

Биологический материал. Этапы селективного обогащения в бульонах (RVS и селенитовый) с последующим пересевом на дифференциально-диагностические среды (агар МакКонки-ГРМ, висмут-сульфит-ГРМ-агар, агар Плоскирева-ГРМ, агар Эндо-ГРМ и Гектоенагар) позволили отобрать всего 74 образца. Некоторые чашки с питательными агарями Эндо-ГРМ и Плоскирева-ГРМ в дальнейшей работе не использовались из-за невозможности выделить чистую культуру из-за присутствия бактерии рода протей, частично затянувшего поверхность питательной среды в виде образных налетов.

На чашках с посевами остальных образцов подозрительных колоний не обнаружено.

По культуральным свойствам отобраны 117 чашек с ростом, где были обнаружены лактозоотрицательные и сероводородположительные колонии.

Подозрительные на принадлежность к роду *Salmonella* колонии по 1–6 с чашки идентифицировались по культуральным, морфологическим, тинкториальным, ферментативным и антигенным свойствам.

На отобранных чашках Петри с питательными средами обнаружены сформированные колонии с типичной для сальмонелл морфологией: на агаре Эндо-ГРМ – бесцветные или слегка розового цвета; на агаре Плоскирева-ГРМ – круглые бесцветные или слегка розового цвета колонии; на агаре МакКонки-ГРМ – бледно-розовые колонии; на Гектоенагаре – зеленовато-голубые колонии с черным центром; на висмут-сульфит-ГРМ-агаре – черные или темно-зеленые колонии с металлическим блеском и окрашиванием среды под колониями в черный цвет.

Таблица. Выделенные бактерии рода *Salmonella* spp. при использовании питательных сред: агар МакКонки-ГРМ, агар Плоскирева-ГРМ, агар Эндо-ГРМ, висмут-сульфит-ГРМ-агар, Гектоенагар

№ п/п	Источник	Наименование образца	Выделенный серовар (по результатам исследования)
1.	корма	хрустики из рубца барана XXL – мягкая упаковка	<i>S. Derby</i>
2.	корма	отходы от переработки мясoproдуктов животных	<i>S. Derby</i>
3.	корма	отходы от переработки мясoproдуктов животных	<i>S. Reading</i>
4.	корма	желудок бараний – B2-L	I-фазный <i>S. Typhimurium</i>
5.	корма	мясные и рыбные корма для пушных зверей	<i>S. Give</i>
6.	корма	мясные и рыбные корма для пушных зверей	<i>S. Infantis</i>
7.	корма	мясные и рыбные корма для пушных зверей	<i>S. Infantis</i>
8.	корма	мясные и рыбные корма для пушных зверей	<i>S. Enteritidis</i>
9.	корма	части кролика непищевые замороженные	I-фазный <i>S. Typhimurium</i>
10.	корма	части кролика непищевые замороженные	<i>S. Oranienburg</i>
11.	корма	хрустики из рубца барана XXL – мягкая упаковка	<i>S. Rissen</i>
12.	корма	мясные и рыбные корма для пушных зверей	<i>S. Enteritidis</i>
13.	корма	мясные и рыбные корма для пушных зверей	<i>S. Enteritidis</i>
14.	корма	мясные и рыбные корма для пушных зверей	<i>S. Enteritidis</i>

15.	корма	мясные и рыбные корма для пушных зверей	<i>S. Enteritidis</i>
16.	корма	мясные и рыбные корма для пушных зверей	<i>S. Enteritidis</i>
17.	корма	мясные и рыбные корма для пушных зверей	<i>S. Infantis</i>
18.	корма	мясные и рыбные корма для пушных зверей	<i>S. Infantis</i>
19.	корма	мясные и рыбные корма для пушных зверей	<i>S. Infantis</i>
20.	корма	мясные и рыбные корма для пушных зверей	<i>S. Infantis</i>
21.	корма	шейки куриные – мягкая упаковка лакомство для собак	<i>S. Uganda</i>
22.	корма	колечки из трахеи – мягкая упаковка лакомство для собак	<i>S. Uganda</i>
23.	корма	шейки куриные – мягкая упаковка лакомство для собак	<i>S. Uganda</i>
24.	корма	шейки куриные для собак	<i>S. Kedougou</i>
25.	животные	трупы птиц	<i>S. Enteritidis</i>
26.	животные	трупы птиц	<i>S. Enteritidis</i>
27.	животные	трупы птиц	<i>S. Enteritidis</i>
28.	животные	трупы птиц	<i>S. Enteritidis</i>
29.	животные	помет птиц	<i>S. Enteritidis</i>
30.	животные	помет птиц	<i>S. Enteritidis</i>
31.	животные	помет птиц	<i>S. Enteritidis</i>
32.	животные	помет птиц	<i>S. Derby</i>
33.	животные	помет птиц	<i>S. Brandenburg</i>
34.	животные	фекалии крупного рогатого скота	<i>S. Dublin</i>
35.	животные	фекалии крупного рогатого скота	<i>S. Dublin</i>
36.	животные	фекалии крупного рогатого скота	<i>S. Dublin</i>

Ферментативные свойства бактерий, подозрительных на принадлежность к сальмонеллам, определяли на среде Клиглера-ГРМ и на стрипах для биохимической идентификации API 20E. Антигенные свойства – в РА с сыворотками сальмонеллезными диагностическими адсорбированными ПЕТСАЛ®. Серологический вариант штамма определяли в соответствии со схемой Кауфмана–Уайта. Видовая идентификация подтверждалась с помощью метода времяпролетной MALDI-TOF масс-спектрометрии.

После дополнительных тестов для всех лактозоотрицательных и сероводородположительных микроорганизмов, выросших на испытуемых средах, родовая и видовая принадлежность к сальмонеллам подтверждена только у 36 изолятов, остальным отобраным образцам дано отрицательное заключение «сальмонеллы не обнаружены».

Из 240 исследованных образцов (корма для животных и биологический материал) с использованием всех питательных сред было выделено 36 изолятов: *S. Derby* – 3, *S. Reading* – 1, *S. Typhimurium* – 2, *S. Give* – 1, *S. Infantis* – 6, *S. Enteritidis* – 13, *S. Oranienburg* – 1, *S. Rissen* – 1, *S. Uganda* – 3, *S. Kedougou* – 1, *S. Brandenburg* – 1, *S. Dublin* – 3 (таблица).

В результате всех проведенных исследований отмечено, что питательные среды Эндо-ГРМ и Плоскирева-ГРМ обеспечивали дифференциацию лактозоотрицательных сальмо-

нелл от лактозоположительных, но при посеве некоторых образцов помета птиц, содержащих большое количество бактерий рода *Proteus*, было отмечено очаговое роение, которое затрудняло выделение искомым бактерий. Агар МакКонки также позволяет провести дифференциацию микроорганизмов по признаку ферментации лактозы, но на среде отмечался рост грамположительной микрофлоры, что также затрудняло выделение патогена.

Висмут-сульфит-ГРМ-агар обладал более выраженными ингибирующими свойствами в отношении ряда энтеробактерий и грамположительной микрофлоры. Положительным фактором явилось отсутствие роения протеев, что способствовало выделению сальмонелл. Но при исследовании некоторых образцов помета и фекалий, содержащих большое количество эшерихий, при длительной инкубации посевов до 48 ч обнаруживался рост *Escherichia coli*, что затрудняло выделение сальмонелл из-за сходной их морфологии с эшерихиями.

Дифференциально-селективная питательная среда для выделения шигелл и сальмонелл (Гектоенагар) обеспечивала хороший рост бактерий родов *Salmonella* и их четкую дифференциацию от других представителей энтеробактерий. Рост эшерихий на Гектоенагаре значительно подавлялся, что явилось преимуществом этой питательной среды при исследовании биологического материала животных.

Заключение

Сравнительные исследования качества всех используемых питательных сред при выделении сальмонелл из кормов и биологического материала животных показали, что питательные среды агар Эндо-ГРМ, агар Плоскирева-ГРМ и агар МакКонки-ГРМ обеспечивали дифференциацию лактозоотрицательных сальмонелл от лактозоположительных бактерий, но на средах агар Эндо-ГРМ, Агар Плоскирева-ГРМ наблюдался рост протей в виде очагового роения, а на агаре МакКонки-ГРМ был замечен рост грамположительной микрофлоры, что затрудняло выявление искомым патогенов.

Висмут-сульфит-агар обладал выраженной селективностью, но длительная инкубация посевов (до 48 ч при исследовании некоторых образцов) приводила к росту других представителей энтеробактерий, сходных по морфологии.

Использование современной питательной среды Гектоагар позволило не только определить состав микробных ассоциаций за счет четких дифференцирующих свойств, но и в силу выраженных селективных свойств среды подавить нежелательную сопутствующую микрофлору.

Использование рекомендованных нормативными документами Российской Федерации питательных сред в ветеринарных лабораториях ограничивает возможность применения более современных с улучшенными ростовыми и дифференциально-диагностическими свойствами питательных сред. В этой связи необходима актуализация методик исследования кормов для животных, а также патологического и биологического материала животных по выделению сальмонелл. Внедрение современных эффективных питательных сред в методические документы позволит повысить результативность бактериологических исследований в ветеринарных лабораториях.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора и ИЦНМВЛ.

Financial support

The work was carried out under the industry Rospotrebnadzor and CNMVL program.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest to be disclosed in this paper.

Литература

1. Технический регламент Таможенного союза. О безопасности пищевой продукции: ТРТС 021/2011–Введ. 3013-07-01. М.: РосТест; 2013, 242 с.

2. Шепелин АП, Полосенко ОВ, Марчихина ИИ, Шолохова ЛП, Ажермачева НИ, Ершова МГ, Поletaева ЕД. Клинические испытания питательных сред для накопления сальмонелл. Клиническая лабораторная диагностика. 2018;63(9):557-63. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-9-557-563
3. Микробиологический контроль качества пищевой продукции. Под ред. Поповой АЮ, Дятлова ИА. М.: Издательство «Династия»; 2022, 448 с.
4. Шепелин АП, Полосенко ОВ, Домотенко ЛВ. Питательные среды для санитарной микробиологии. М.: Издательство «Династия»; 2021, 192 с.
5. Полосенко ОВ, Шепелин АП. Сравнительный анализ питательных сред для определения биохимических свойств энтеробактерий. Бактериология. 2020;5(1):41-47. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-41-47
6. Ручнова ОИ, Куркина ЕС. Биологические свойства изолятов бактерий рода *Salmonella*. Евразийский Союз Ученых (ЕСУ). 2016;30-1:11-4
7. Правила бактериологического исследования кормов, 1975. Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/1200086349>
8. Методические указания. МУ 4.2.2723-10 Лабораторная диагностика сальмонеллез, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2011, 111 с.

References

1. Technical Regulations of the Customs Union. About food safety: TRTS 021/2011–Introduction. 3013-07-01. Moscow: RosTest; 2013, 242 p. (In Russian).
2. Shepelin AP, Polosenko OV, Marchikhina II, Sholokhova LP, Azhermacheva NI, Ershova MG, Poletaeva ED. Clinical trials of salmonella enrichment medium. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2018;63(9):557-63. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-9-557-563 (In Russian).
3. Microbiological quality control of food products. Edited by Popova AY, Dyatlov IA. Moscow: "Dynasty" Publ.; 2022, 448 p. (In Russian).
4. Shepelin AP, Polosenko OV, Domotenko LV. Nutrient media for sanitary microbiology. Moscow: "Dynasty" Publ.; 2021, 192 p. (In Russian).
5. Polosenko OV, Shepelin AP. Comparative analysis of nutrient media for determination of the biochemical properties of enterobacteria. Bacteriology. 2020;5(1):41-47. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-41-47 (In Russian).
6. Ruchnova OI, Kurkina ES. Biological properties of isolates of bacteria of the genus *Salmonella*. Eurasian Union of Scientists. 2016;30-1:11-4. (In Russian).
7. Rules of bacteriological examination of feed, 1975. Available at: Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/1200086349> (In Russian).
8. Methodological guidelines. MU 4.2.2723-10 Laboratory diagnostics of salmonellosis, detection of salmonella in food and environmental objects. Moscow: Federal Center of Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor; 2011, 111 p. (In Russian).

Информация о соавторе:

Кремлева Анна Александровна, научный сотрудник ФГБУ ВНИИЗЖ «Федеральный центр охраны здоровья животных»

Домотенко Любовь Викторовна, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Anna A. Kremleva, researcher, Federal Center for Animal Health

Lubov V. Domotenko, PhD (Chemical Sciences), Leading Researcher, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Сравнительная оценка антибактериальной эффективности рифабутина и комбинации рифабутина с 4-гексилрезорцином в отношении антибиотикорезистентных *Mycobacterium tuberculosis in vitro*

О.Ю.Манзенюк¹, Ю.А.Николаев^{1,2}, Т.Н.Мухина¹, В.В.Фирстова¹, Э.И.Кязимов³, И.Г.Шемякин¹

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация;

²ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Российская Федерация;

³ООО «Супербаг солишенс», Москва, Российская Федерация

Антимикробная добавка 4-гексилрезорцин (ГР) использовалась ранее для усиления действия антибиотиков в отношении нетуберкулезных лабораторных штаммов. Для повышения эффективности противотуберкулезных препаратов ГР применяется впервые.

Было показано снижение в 2 раза минимальной ингибирующей концентрации (МИК) антибиотика рифабутин в присутствии ½ МИК ГР. МИК рифабутина снизилась с 0,06 до 0,03 мкг/мл на фоне ½ МИК ГР (25 мкг/мл) только для штамма *Mycobacterium tuberculosis* 5360/42 (мутации в гене *katG*: 315 ACC).

Таким образом, хотя ГР нельзя отнести к универсальным адьювантам противотуберкулезных препаратов, однако его комбинацию с рифабутином следует рассматривать как перспективный вариант поиска относительно дешевых схем лечения туберкулезной инфекции в случае, когда препараты первого ряда не эффективны.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, 4-гексилрезорцин, туберкулез, антибиотикорезистентность, рифабутин

Для цитирования: Манзенюк О.Ю., Николаев Ю.А., Мухина Т.Н., Фирстова В.В., Кязимов Э.И., Шемякин И.Г. Сравнительная оценка антибактериальной эффективности рифабутина и комбинации рифабутина с 4-гексилрезорцином в отношении антибиотикорезистентных *Mycobacterium tuberculosis in vitro*. Бактериология. 2022; 7(4): 66–68. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-66-68

Comparative evaluation of the antibacterial effectiveness of rifabutin and a combination of rifabutin with 4-hexylresorcinol against antibiotic-resistant *Mycobacterium tuberculosis in vitro*

O.Yu.Manzenyuk¹, Yu.A.Nikolaev^{1,2}, T.N.Mukhina¹, V.V.Firstova¹, E.I.Kazimov³, I.G.Shemiyakin¹

¹State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;

²Fundamental Foundations of Biotechnology RAS, Moscow, Russian Federation;

³LLC «Superbug Solutions», Moscow, Russian Federation

The antimicrobial adjuvant 4-hexylresorcinol (HR) has previously been used to enhance the antibiotics effect against non-tuberculosis laboratory strains. Here HR was applied for the first time in order to increase the effectiveness of anti-tuberculosis medicines.

A 2-fold decrease in the minimum inhibitory concentration (MIC) of the antibiotic rifabutin was shown in the presence of ½ MIC of GR. MIC of rifabutin decreased from 0.06 to 0.03 µg/ml in the presence of ½ MIC GR (25 µg/ml) for *Mycobacterium tuberculosis* strain 5360/42 only (mutations in the *katG* gene: 315 ACC).

Thus, it is important to mention that HR is not universal adjuvant of anti-TB preparations, however, in combination with rifabutin, it may be a promising option for relatively cheap treatment regimens for tuberculosis infection when 1st-line drugs are not effective.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, 4-hexylresorcinol, tuberculosis, antibiotic resistance, rifabutin

Для корреспонденции:

Манзенюк Оксана Юрьевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24

E-mail: manzenyuk@obolensk.org

Статья поступила 26.10.2022 г., принята к печати 28.12.2022 г.

For correspondence:

Oksana Yu. Manzenyuk, MD, PhD, Senior Researcher of Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation

E-mail: manzenyuk@obolensk.org

The article was received 26.10.2022, accepted for publication 28.12.2022

For citation: Manzenyuk O.Yu., Nikolaev Yu.A., Mukhina T.N., Firstova V.V., Kazimov E.I., Shemyakin I.G. Comparative evaluation of the antibacterial effectiveness of rifabutin and a combination of rifabutin with 4-hexylresorcin against antibiotic-resistant *Mycobacterium tuberculosis in vitro*. Bacteriology. 2022; 7(4): 66–68. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-66-68

Согласно Докладу Всемирной организации здравоохранения о глобальной борьбе с туберкулезом 2021 г., из-за пандемии COVID-19 впервые за десять лет показатели смертности от туберкулеза возросли [2]. Заболеваемость туберкулезом в России составила 41,2 на 100 тыс. населения, смертность – 30% [3].

Для предотвращения подъема заболеваемости туберкулезной инфекцией особую актуальность приобретает задача создания комбинаций препаратов из уже известных соединений, обладающих синергическим действием и преодолевающих порог устойчивости к монопрепаратам [4]. Необходимым параметром отбора таких комбинаций является снижение действующих доз антибиотиков и статистически достоверное уменьшение численности бактерий.

Целью исследования является изучение антибактериальной эффективности антибиотика рифабутин в комбинации с гексилрезорцином (ГР) в отношении антибиотикорезистентных микобактерий *Mycobacterium tuberculosis in vitro*.

Материалы и методы

Для определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) использовали экспресс-метод с функциональным красителем Alamar Blue [5], а также традиционный метод – по наличию или отсутствию роста микобактерий на питательных средах.

Метод 1. К раститрованным в планшетах противотуберкулезным препаратам добавляли ГР в концентрациях, равных ½ МИК. Далее в лунки планшетов вносили микобактериальную культуру (по 100 мкл в концентрации 10⁶ кл./мл.), инкубировали в течение 2 суток при 37°C и затем добавляли краситель Alamar Blue (Sigma) до концентрации 50 мкМ. В присутствии живых клеток происходило восстановление красителя и развитие розовой окраски, интенсивность которой прямо пропорциональна количеству активных клеток. Через 24 ч результаты учитывали с помощью микропланшетного флуориметра (Микропланшетный фотометр-флуориметр «ФФМ-01», Россия).

Величину антибактериальной активности (АА, снижение роста от контроля в процентах) препарата вычисляли согласно формуле:

$$AA = (1 - (FI_{(препарат)}/FI_{(контроль\ культуры)}) \times 100,$$

где FI – интенсивность флуоресценции.

За пороговый уровень принята величина 20%.

Метод 2. Для определения МИК противотуберкулезных препаратов и ГР из лунок планшетов, содержащих микобактерии с препаратами в различных концентрациях, инкубированных в течение 28 суток, делали высевы на плотную питательную среду Middlebrook 7H10 (HiMedia) с добавлением 10% ростовой добавки OADS (HiMedia). Посевы инкубировали в термостате при 37°C в течение 21–28 дней. За МИК принимали наименьшую концентрацию препарата, при которой отсутствовал рост в лунках планшета.

Результаты и обсуждение

Вначале была исследована противотуберкулезная активность 6 антимикробных препаратов. МИК шести противотуберкулезных препаратов (рифабутин, офлоксацин, амикацин, капреомицин, стрептомицин, кларитромицин) варьировали для антибиотикоустойчивых штаммов *M. tuberculosis* от 0,06 (рифабутин) до 128 мкг/мл (стрептомицин). Для ГР МИК составил 50 мкг/мл. На фоне ½ МИК ГР (25 мкг/мл) для резистентного штамма *M. tuberculosis* 5360/42 концентрация рифабутин снизилась с 0,06 до 0,03 мкг/мл.

Для оценки антимикробной активности по уровню флуоресценции функционального красителя Alamar Blue вначале был определен пороговый (фоновый) уровень флуоресценции, который по нашим расчетам не превышал 20%. Для рифабутин величина АА равнялась 32,55%, для комбинации рифабутин + ГР – 31,62%.

Таким образом, стало очевидным, что комбинация рифабутин + гексилрезорцин может быть отобрана для дальнейших исследований *in vivo* на модели туберкулеза мышей.

Впоследствии данные результаты могут послужить основой для поиска новых схем лечения туберкулеза в тех случаях, когда противотуберкулезные препараты первого ряда не эффективны,

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора, а также при финансовой поддержке Фонда «ИЦ Сколково» (микрогрант №40113/07003/0415-2018).

Financial support

The work was carried out within the framework of the branch program of Rosпотребнадзор, as well as with financial support Foundation "IC Skolkovo" (micro-grant No. 40113/07003/0415-2018).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

- Shemyakin IG, Manzenyuk OY, El'-Registan GI, Firstova VV, Kombarova TI, Gneusheva TY, Kyazimov EI, Nikolaev YA. Effect of 4-Hexylresorcinol on the Efficiency of Antibiotic Treatment of Experimental Sepsis Caused by Antibiotic-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strain in Mice. Bull Exp Biol Med. 2021 Aug;171(4):458-460. DOI: 10.1007/s10517-021-05249-6
- Пресс-релиз ВОЗ по туберкулезу. Доступно по: <https://www.who.int/ru/news/item/14-10-2021-tuberculosis-deaths-rise-for-the-first-time-in-more-than-a-decade-due-to-the-covid-19-pandemic>

3. Нечаева ОБ. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в России. Туберкулез и болезни легких. 2018;8(96):15-24.
4. Gill EE, Franco OL, Hancock RE. Antibiotic adjuvants: diverse strategies for controlling drug-resistant pathogens. *Chem Biol Drug Des.* 2015 Jan;85(1):56-78. DOI: 10.1111/cbdd.12478
5. Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A, et al. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J Clin Microbiol.* 1998 Feb;36(2):362-6. DOI: 10.1128/JCM.36.2.362-366.1998

References

1. Shemyakin IG, Manzenyuk OY, El'-Registan GI, Firstova VV, Kombarova TI, Gneusheva TY, Kyazimov EI, Nikolaev YA. Effect of 4-Hexylresorcinol on the Efficiency of Antibiotic Treatment of Experimental Sepsis Caused by Antibiotic-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strain in Mice. *Bull Exp Biol Med.* 2021 Aug;171(4):458-460. DOI: 10.1007/s10517-021-05249-6
2. Press Release WHO. Tuberculosis. Available at: <https://www.who.int/ru/news/item/14-10-2021-tuberculosis-deaths-rise-for-the-first-time-in-more-than-a-decade-due-to-the-covid-19-pandemic> (In Russian).
3. Nechaeva OB. TB situation in Russia. *Tuberculosis and Lung Diseases.* 2018;8(96):15-24
4. Gill EE, Franco OL, Hancock RE. Antibiotic adjuvants: diverse strategies for controlling drug-resistant pathogens. *Chem Biol Drug Des.* 2015 Jan;85(1):56-78. DOI: 10.1111/cbdd.12478
5. Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A, et al. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J Clin Microbiol.* 1998 Feb;36(2):362-6. DOI: 10.1128/JCM.36.2.362-366.1998

Информация о соавторах:

Николаев Юрий Александрович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора; руководитель лаборатории ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Мухина Татьяна Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Фирстова Виктория Валерьевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора; профессор факультета биологической безопасности ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт»

Кязимов Эльман Имранович, руководитель ООО «Супербаг солюшенс»,

Шемьякин Игорь Георгиевич, доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Yury A. Nikolaev, PhD, DSc (Biological Sciences), Leading Researcher of Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор; Head of Laboratory, Federal State Institution FRC Fundamental Foundations of Biotechnology RAS

Tatiana N. Mukhina, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher of Microbial Collection Departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Victoria V. Firstova, PhD, DSc (Biological Sciences), Chief Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор; Professor of the Faculty of Biological Safety, Pushchino State Institute of Natural Science

Elman I. Kyazimov, Head of Superbug Solutions LLC

Igor G. Shemyakin, PhD, DSc (Biological Sciences), Deputy Director of State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

НОВОСТИ НАУКИ

Новое семейство морских бактерий с большим потенциалом для синтеза новых натуральных продуктов

Природные микробные сообщества филогенетически и метаболически разнообразны. В дополнение к малоизученным группам организмов это разнообразие включает в себя богатый потенциал открытия экологически и биотехнологически важных ферментов и биохимических соединений. Биосинтетический потенциал микроорганизмов в открытом океане остается в значительной степени неизведанным из-за ограничений в анализе данных с разрешением генома в глобальном масштабе. Исследовано разнообразие и новизна кластеров биосинтетических генов в океане, интегрировав около 10 000 микробных геномов из культивируемых и одиночных клеток с более чем 25 000 недавно реконструированных черновых геномов из более чем 1000 образцов морской воды. Выявили около 40 000 предполагаемых в основном новых кластеров биосинтетических генов, некоторые из которых были обнаружены в ранее не подозревавшихся филогенетических группах. Среди этих групп идентифицировали линию, богатую кластерами биосинтетических генов (*Candidatus Eudoremicrobiaceae*), которая принадлежит к некультивируемому бактериальному типу и включает некоторые из наиболее биосинтетически разнообразных микроорганизмов в этой среде. Из них охарактеризовали пути фосфептина и питонамида, выявив случаи необычной структуры биоактивных соединений и энзимологии соответственно. Это исследование демонстрирует, как стратегии, основанные на микробиомике, могут позволить исследовать ранее неописанные ферменты и натуральные продукты в малоизученных микробных группах и средах.



Paoli L, Ruscheweyh HJ, Forneris CC, et al.

Biosynthetic potential of the global ocean microbiome. *Nature.* 2022 Jun 22. DOI: 10.1038/s41586-022-04862-3

Перспективы разработки тест-систем, выявляющих патогенные микроорганизмы и белковые токсины с максимальными показателями экспрессности, чувствительности и специфичности

С.Г.Игнатов, И.Ю.Щит, Е.В.Баранова, А.Г.Волошин, С.Ф.Бикетов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Бактериальные патогены и их токсины являются одними из главных причин заболеваний и существенно влияют на здоровье населения в стране и во всем мире. Современные методы обнаружения патогенов и токсинов различаются по специфичности, скорости реакции, чувствительности, точности и стоимости. Некоторые биоаналитические системы могут обнаруживать, анализировать и количественно определять наличие биологических агентов с высокой чувствительностью, но имеют недостаточную точность или скорость. Другие требуют слишком много времени для прободготовки и поэтому не могут быть использованы для экспресс-тестирования.

В этом обзоре рассматриваются различные технологии обнаружения патогенов и токсинов для формирования подхода по разработке эффективных тест-систем, выявляющих патогенные микроорганизмы и белковые токсины. На основании проанализированных данных предполагается, что сочетание наномангнитной сепарации и петлевой изотермической амплификации (LAMP) является перспективным для выявления патогенных микроорганизмов и белковых токсинов с максимальными показателями экспрессности, чувствительности и специфичности.

Ключевые слова: тест-системы, патогенные микроорганизмы, белковые токсины

Для цитирования: Игнатов С.Г., Щит И.Ю., Баранова Е.В., Волошин А.Г., Бикетов С.Ф. Перспективы разработки тест-систем, выявляющих патогенные микроорганизмы и белковые токсины с максимальными показателями экспрессности, чувствительности и специфичности. Бактериология. 2022; 7(4): 69–73. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-69-73

Prospects for the development of test systems that detect pathogenic microorganisms and protein toxins with maximum rates of rapidity, sensitivity and specificity

S.G.Ignatov, I.Yu.Shchit, E.V.Baranova, A.G.Voloshin, S.F.Biketov

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

Bacterial pathogens and bacterial toxins are the one of the main cause of disease and significantly affect the health people of all country in the world. Pathogen and toxin detection methods can vary in specificity, reaction speed, sensitivity, accuracy and cost. The some systems can detect, analyze and quantify the presence of biological agents with high sensitivity but have insufficient precision and rapidity. Other systems to require too match time for sample preparation and can't use for express testing.

This mini review discusses various technologies for the detection of pathogens and toxins to form an approach for the development of test systems. Based on the analyzed data, it is assumed that the combination of nanomagnetic separation and loop isothermal amplification (LAMP) is a promising system for the detection of pathogenic microorganisms and protein toxins with maximum rapidity, sensitivity, and specificity.

Key words: test systems, pathogenic microorganisms, protein toxins

For citation: Ignatov S.G., Shchit I.Yu., Baranova E.V., Voloshin A.G., Biketov S.F. Prospects for the development of test systems that detect pathogenic microorganisms and protein toxins with maximum rates of rapidity, sensitivity and specificity. Bacteriology. 2022; 7(4): 69–73. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-69-73

Для корреспонденции:

Игнатов Сергей Георгиевич, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0773
E-mail: ignatov@obolensk.org

Статья поступила 10.11.2022 г., принята к печати 28.12.2022 г.

For correspondence:

Sergey G. Ignatov, PhD, DSc (Biological Sciences), Chief Researcher, Laboratory of Nanobiotechnology, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0773
E-mail: ignatov@obolensk.org

The article was received 10.11.2022, accepted for publication 28.12.2022

Бактериальные патогены и их токсины являются одними из главных причин заболеваний и существенно влияют на здоровье населения в стране и во всем мире. Поскольку в последнее время значительное количество людей пострадало от инфекций пищевого происхождения, пищевые патогены являются актуальной проблемой здравоохранения в глобальном масштабе [1]. Основными бактериальными возбудителями пищевых инфекций являются патогенные штаммы *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* и *Bacillus cereus*. Особо опасным является возбудитель холеры *Vibrio cholera*, периодически вызывающий значительные эпидемии, в ходе которых погибает множество людей.

Точно оценить распространенность болезней пищевого происхождения в глобальном масштабе сложно, но известно [2], что каждый шестой житель США (или 48 млн человек) заболевает, а 3000 человек ежегодно умирают от пищевых инфекций. Высокий уровень этих болезней в странах с развивающейся экономикой создает серьезные проблемы и трудности в здравоохранении и в области безопасности пищевых продуктов, поэтому важно уметь выявлять основных патогенов, чтобы контролировать болезни пищевого происхождения.

Наряду с собственно патогенными бактериями большую роль в патогенезе играют бактериальные токсины, негативно воздействующие на организм человека. Энтеротоксины А и В, вырабатываемые такими патогенами, как золотистый стафилококк, являются частыми причинами острых пищевых отравлений. Патоген *E. coli* O157:H7 продуцирует шига-подобные токсины 1 и 2, вызывающие дизентерию, геморрагический колит и гемолитико-уремический синдром. *Listeria monocytogenes* продуцирует экзотоксин – листериолизин О, который обладает гемолитической активностью. Липополисахариды (ЛПС) на внешней мембране грамотрицательных бактерий ряда патогенов также вносят существенный вклад в патогенез кишечных инфекций.

Существует несколько традиционных методов обнаружения патогенов и токсинов, которые основаны на культивировании микроорганизмов на чашках с агаром. Все традиционные методы трудоемки и требуют от 2–3 дней для получения первых результатов. Для определения конкретных возбудителей микроорганизмов требуется до одной недели. Поэтому востребованы различные более быстрые и чувствительные методы обнаружения возбудителей.

Наряду с микробиологическими методами используются и другие разнообразные подходы – это хорошо известные методы оценки по потреблению кислорода [3, 4], молекулярно-генетические [5], иммунологические методы [6], атомно-силовая микроскопия для идентификации клеточных фрагментов [7] и идентификация бактерий по запаху (система искусственного носа) [7].

Методы обнаружения можно разделить на две основные группы: традиционные и различные сенсорные методы.

Традиционные методы

Существует несколько методов обнаружения патогенов и эндотоксинов грамотрицательных бактерий или только самого эндотоксина. Обнаружение эндотоксина определяется структурой ЛПС на внешней мембране грамотрица-

тельных бактерий. Базовая химическая структура ЛПС состоит из четырех ковалентно связанных сегментов: поверхностного углеводного полимера, центрального олигосахарида с внутренней и внешней областью и ацилированного гликолипида.

Методы обнаружения возбудителя

В традиционных методах обнаружение патогенов в основном зависит от точной идентификации микробиологических и биохимических компонентов. Существует три типа традиционных методов: метод, основанный на иммунологии, метод подсчета колоний и метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) [9].

Метод культивирования дает точные результаты благодаря своей высокой селективности и чувствительности [10]. Этот процесс требует селективного посева, предварительного обогащения, селективного обогащения и идентификации, которые занимают несколько дней для получения результатов. Этот метод обнаружения является трудоемким и длительным.

ПЦР является очень популярным методом обнаружения патогенов [11]. Для обнаружения патогенов доступны различные методы: ПЦР с обратной транскрипцией, с помощью которой можно определить даже живые бактериальные клетки [12], ПЦР в реальном времени [13] и мультиплексная ПЦР [14]. Однако для этого метода требуются дорогостоящие инструменты, а амплификация, выделение и количественная оценка технологии ДНК делают его сложным для выполнения. Кроме того, для выполнения всей процедуры требуется обученный персонал.

Иммунологический метод широко используется для обнаружения патогенов [15]. Связи антиген–антитело используются для иммунологического обнаружения патогенов грамотрицательных бактерий. Этот метод был успешно использован для обнаружения *Salmonella* и *E. coli*. Иммуоферментный анализ [16], твердофазный флуоресцентный анализ (ELFA) [17], твердофазный иммуоферментный анализ (ELISA) [18], проточно-инъекционный иммуоанализ [19] и другие иммунологические методы [20] требуют меньше времени для подготовки анализа, чем метод культивирования. Однако обнаружение патогенов в режиме реального времени с помощью этого метода невозможно.

Методы обнаружения эндотоксина

Методы, основанные на пирогенности для кролика, используются для обнаружения эндотоксинов и считаются традиционными. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) одобрило их в качестве стандартных. В 1920 г. впервые был разработан пирогенный тест на кроликах. Тестовый раствор вводят в тело кролика и некоторое время ждут изменения температуры тела для обнаружения эндотоксина. Однако группа по защите прав животных выступила против использования этого метода, требуя прекратить убивать кроликов. Кроме того, метод является трудоемким и дорогостоящим. В настоящее время он теряет популярность, и используется только тест анализа крови мечехвоста, при котором образуются сгустки в результате воздействия эндотоксинов [21].

Методы на основе биосенсоров

Датчик измеряет физические и химические параметры объекта и преобразует их в электрический сигнал. Сенсоры – это своего рода преобразователи, которые преобразуют один вид сигнала в другой. Датчик может измерять большую часть физической активности, например температуру, влажность, ускорение, расстояние и многое другое. Биосенсор – это устройство, которое использует живые организмы или биологические молекулы для обнаружения химических веществ, присутствующих в живых организмах.

Распознавание достигается в процессе взаимодействия системы узнавания сенсора при связывании с целевым патогеном. В биосенсоры были введены различные биорецепторы для повышения эффективности измерения. Биорецепторы играют важную роль в развитии биосенсоров, и различные типы биорецепторов обсуждаются в следующем разделе [22].

Обнаружение патогенов и токсинов на ранней стадии имеет решающее значение для предотвращения негативных последствий. Существуют различные методы их обнаружения. Обычные методы в основном основаны на лабораторных исследованиях и требуют много времени для обнаружения патогенов и токсинов. Было разработано много новых подходов, таких как биосенсоры на основе электрохимических, оптических и наноматериалов. Каждый разработанный метод имеет свои преимущества и недостатки. Принятый метод должен быть надежным, точным и селективным к конкретному патогену/токсину, а также достаточно быстрым для получения надежных результатов.

Анализ вышеприведенных данных по выявлению патогенных микроорганизмов и токсинов показал, что результат с максимальными показателями экспрессности, чувствительности и специфичности может быть достигнут при комбинировании магнитной сепарации и метода петлевой изотермической амплификации (LAMP).

Современные методы разделения (сепарирования) клеток являются важным инструментом в таких разнообразных областях биологических и биомедицинских исследований, как биодетекция, тестирование лекарств, тканевая инженерия, клеточная терапия и клиническая диагностика. Выделение клеточной популяции из гетерогенного образца позволяет идентифицировать, изучать и анализировать определенные типы клеток, уменьшая при этом загрязнение другими. При выборе стратегии разделения клеток необходимо учитывать множество критериев, в зависимости от способа применения и его требований и ограничений с точки зрения пропускной способности, чистоты, жизнеспособности извлеченных клеток, выхода, маркировки, простоты использования, стоимости и времени обработки

Сортировка магнитно-активированных клеток (МАК) является одним из наиболее широко используемых подходов к разделению клеток, наряду с методами градиента плотности и методологиями, основанными на адгезии [23]. Сортировщики клеток представляют собой мощное оборудование, обеспечивающее высокую скорость сортировки клеток (>50 000 клеток/с) и высокую чистоту (приближающуюся к 100%). Более того, сортировщики клеток достаточно универсальны, поскольку позволяют разделять клетки по их поверхностным маркерам, а также по размеру и зернистости на основе флуоресцентных свойств или рассеянного ими света. Метод применения магнит-

ных наночастиц (МНЧ) экономически эффективнее и быстрее многих традиционных методов выделения патогенов. Некоторые приложения, такие как иммуномагнитная сепарация, использовались в нескольких анализах в сочетании с методами ПЦР и биосенсорного анализа для быстрого определения концентрации бактерий. Однако отсутствие стандартизации МНЧ препятствует их использованию в настоящее время в качестве метода выделения пищевых патогенов. Хотя иммуномагнитная сепарация является наиболее изученным методом, ей все еще не хватает стандартизации и автоматизации, которые позволили бы широко ее использовать.

Методы амплификации нуклеиновых кислот (НК) очень эффективно используются для диагностики различных инфекционных заболеваний. Поскольку НК считаются важными биомаркерами заболеваний, опосредованных патогенами, методы обнаружения их присутствия обычно используются для точного обнаружения и идентификации возбудителя. ПЦР считается золотым стандартом в молекулярной диагностике на основе НК. Методы изотермической амплификации были разработаны для обнаружения НК в клинических образцах, чтобы обойти проблемы, связанные с обычной ПЦР [24]. Методы петлевой изотермической амплификации (LAMP) являются наиболее популярными методами для амплификации и обнаружения НК [25]. Они базируются на использовании трех пар праймеров для специфического связывания с ДНК-мишенью в присутствии ДНК-полимеразы. LAMP доказала свое превосходство над ПЦР за счет специфической амплификации ДНК-мишени даже при совместном присутствии нецелевых последовательностей, устраняя при этом необходимость в нескольких температурных циклах, длительном времени реакции и сложном лабораторном оборудовании. За прошедшие годы был достигнут ряд успехов в повышении эффективности анализа LAMP. Комбинация LAMP с различными молекулярными подходами, такими как методы обнаружения в реальном времени и мультиплексные методы в сочетании с различными методами колориметрического и визуального обнаружения для легкой идентификации положительных образцов, обуславливает простоту в эксплуатации скрининг образцов [26].

С момента своего появления LAMP была одним из наиболее широко применяемых методов амплификации в инструментах молекулярной диагностики. Было показано, что данный метод обнаруживает широкий спектр патогенов от простой *E. coli* [27] до новейшего SARS-CoV-2 [28]. За последние время LAMP приобрела огромную популярность как быстрый и экономичный метод обнаружения возбудителей инфекционных заболеваний. Из-за нехватки ресурсов и ограниченных лабораторных условий в этих областях LAMP оказалась революционным методом для мониторинга терапии, ранней диагностики заболеваний и отслеживания контактов.

Сочетание МНЧ и LAMP может повысить потенциал чувствительности определения патогенов при сочетании магнитофоретической хроматографии и изотермической амплификации нуклеиновых кислот.

В рамках НИОКР «Разработка экспрессных тест-систем, позволяющих выявлять патогенные биологические агенты за 60 мин» (ЩИТ) совместное применение магнитоуправляемой сепарации и изотермической амплификации нуклеиновых кислот исследовано для патогенов *V. cholerae* и *Brucella* spp.

Нуклеиновые кислоты из штаммов *V. cholerae* и *Brucella* spp. выделяли двумя способами: с предварительной пробоподготовкой на иммуномагнитных частицах с конъюгированными моноклональными антителами к поверхностным антигенам или без нее, для выделения ДНК использовали набор реагентов «РибоПреп» («ИнтерЛабСервис»). Для пробоподготовки *Brucella* spp. использовали магнитные частицы magFG11, для *V. cholerae* – magF8G12.

Для конструирования наномагнитных частиц были выбраны частицы размером 200 нм (Chemicell, Германия), поверхность которых содержит свободные карбоксильные группы. Антитела к антигенам исследуемых патогенов получали с помощью гибридной технологии. Конъюгирование моноклональных антител проводили карбодиимидным методом через карбоксилированные магнитные частицы. Суть использования наномагнитных частиц состоит в том, чтобы увеличить концентрацию патогена в анализируемом образце до уровня предела обнаружения метода детекции. Иммуномагнитная сепарация используется для улучшения чувствительности детекции патогена вместо культивирования микроорганизмов, которое может занимать продолжительное время (18–72 ч). Магнитные частицы, связанные со специфическими антителами, селективно захватывают детектируемый микроорганизм и способствуют удалению мешающих анализу примесей из сложного образца.

Для изотермической амплификации возбудителей холеры и бруцеллеза использовали наборы праймеров, которые направляют синтез фрагментов генов, специфических для данных микроорганизмов: ген-мишень для детекции возбудителя холеры – *ctxA*, бруцеллеза – *omp25*.

В результате проведенного анализа установлено, что аналитическая чувствительность метода при сочетании магнитоуправляемой сепарации и изотермической амплификации составила не менее 1×10^2 кл./мл *V. cholerae* и не менее 1×10^3 кл./мл *Brucella* spp. Без предварительной пробоподготовки на наномагнитных частицах чувствительность анализа была на порядок ниже и не превышала 1×10^3 кл/мл для *V. cholerae* и 1×10^4 кл/мл для *Brucella* spp.

Информация о финансировании

Работа выполнена по НИОКР 3.2 в рамках государственного задания.

Financial support

The work was carried out within the framework of R&D 3.2 within the framework of the state assignment.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература / References

- Oliver SP, Jayarao BM, Almeida RA. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathog Dis.* 2005 Summer;2(2):115-29. DOI: 10.1089/fpd.2005.2.115
- Services U.S.D.O.H.H. Cdc: Estimates of Foodborne Illness in the United States. [(accessed on 14 August 2017)]; Available online: <https://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>
- Ignatov SG, Krasilnikov VA, Perelygin VV, Kapreliants AS, Ostrovskii DN. Functional and structural changes of *E. coli* membranes induced by low temperature freezing]. *Biokhimiia.* 1981Nov;46(11):1996-2003.
- Ignatov SG, Andreeva OV, Evdokimova OA, Artsatbanov VYu, Perelygin VV. Repair of membrane damage caused by low temperature freezing of *E. coli* cells. *Biokhimiia.* 1982 Oct;47(10):1621-8.
- Goncharova YO, Bogun AG, Bahtejeva, IV, et al. Allelic Polymorphism of Anthrax Pathogenicity Factor Genes as a Means of Estimating Microbiological Risks Associated with Climate Change. *Appl Biochem Microbiol.* 2022;58:382-93.
- Korolyova-Ushakova AG, Baranova EV, et al. Comparative Characteristics of the Diagnostic Potential of Mycobacterial Synthetic Antigens for the Serodiagnosis of Lepra and Tuberculosis. *Appl Biochem Microbiol.* 2019;55:696-703. DOI: 10.1134/S0003683819060097
- Dubrovina EV, Fedyukina GN, Kraevsky SV, Ignatyuk TE, Yaminsky IV, Ignatov SG. AFM Specific Identification of Bacterial Cell Fragments on Biofunctional Surfaces. *Open Microbiol J.* 2012;6:22-8. DOI: 10.2174/1874285801206010022
- Shannon E. Stitzel, Keith J. Albert, Sergei G. Ignatov, David R. Walt. Artificial nose employing microsphere sensors for detection of volatile organic compounds. *Proceedings Volume 4575, Chemical and Biological Early Warning Monitoring for Water, Food, and Ground; (2002)* DOI: 10.1117/12.456916
- Lee K-M, Runyon M, Herrman TJ, Phillips R, Hsieh J. Review of salmonella detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control.* 2015;47:264-276. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.07.011
- Leoni E, Legnani PP. Comparison of selective procedures for isolation and enumeration of *Legionella* species from hot water systems. *J Appl Microbiol.* 2001;90:27-33. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01178.x
- Oh SJ, Park BH, Jung JH, Choi G, Lee DC, Seo TS. Centrifugal loop-mediated isothermal amplification microdevice for rapid, multiplex and colorimetric foodborne pathogen detection. *Biosens Bioelectron.* 2016;75:293-300. DOI: 10.1016/j.bios.2015.08.052
- Chen M, Lan X, Zhu L, Ru P, Xu W, Liu H. PCR Mediated Nucleic Acid Molecular Recognition Technology for Detection of Viable and Dead Foodborne Pathogens. *Foods.* 2022 Sep 2;11(17):2675. DOI: 10.3390/foods11172675
- Lambertz ST, Nilsson C, Hallanvuori S, Lindblad M. Real-time PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:6060-6067. DOI: 10.1128/AEM.00405-08
- Mukhopadhyay A, Mukhopadhyay UK. Novel multiplex PCR approaches for the simultaneous detection of human pathogens: *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes*. *J Microbiol Methods.* 2007;68:193-200. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.07.009
- Gracias KS, McKillip JL. A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Can J Microbiol.* 2004;50:883-890. DOI: 10.1139/w04-080
- Chapman PA, Malo ATC, Siddons CA, Harkin M. Use of commercial enzyme immunoassays and immunomagnetic separation systems for detecting *Escherichia coli* O157 in bovine fecal samples. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:2549-53.
- De Giusti M, Tufi D, Aurigemma C, Del Cimmuto A, Trinti F, Mannocci A, Boccia A. Detection of *Escherichia coli* O157 in raw and cooked meat: Comparison of conventional direct culture method and enzyme linked fluorescent assay (ELFA) Ital. *J Public Health.* 2011;8:28.
- Song C, Liu C, Wu S, Li H, Guo H, Yang B, et al. Development of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the simultaneous detection of *Shigella boydii* and *Escherichia coli* O157:H7 in bread, milk and jelly samples. *Food Control.* 2016;59:345-351. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.06.012
- Abdel-Hamid I, Ivnitiski D, Atanasov P, Wilkins E. Highly sensitive flow-injection immunoassay system for rapid detection of bacteria. *Anal Chim Acta.* 1999;399:99-108. DOI: 10.1016/S0003-2670(99)00580-2

20. Valdivieso-Garcia A, Desruisseau A, Riche E, Fukuda S, Tatsumi H. Evaluation of a 24-h bioluminescent enzyme immunoassay for the rapid detection of *Salmonella* in chicken carcass rinses. *J Food Protect.* 2003;66:1996-2004. DOI: 10.4315/0362-028X-66.11.1996
21. Bang FB, Frost J.L. The toxic effect of a marine bacterium on limulus and the formation of blood clots. *Mar Biol Lab.* 1953;105:361-2.
22. Jeon Y, Lee Y, Kim K, Jang G, Yoon Y. Transcription Factor-Based Biosensors for Detecting Pathogens. *Biosensors (Basel).* 2022 Jun 29;12(7):470. DOI: 10.3390/bios12070470
23. Tomlinson MJ, Tomlinson S, Yang XB, Kirkham J. Cell separation: Terminology and practical considerations. *J Tissue Eng.* 2013;4:2041731412472690. DOI: 10.1177/2041731412472690
24. Keikha M. LAMP Method as One of the Best Candidates for Replacing with PCR Method. *Malays J Med Sci.* 2018 Feb;25(1):121-123. DOI: 10.21315/mjms2018.25.1.15
25. Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother.* 2009 Apr;15(2):62-9. DOI: 10.1007/s10156-009-0669-9
26. Wong YP, Othman S, Lau YL, Radu S, Chee HY. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *J Appl Microbiol.* 2018 Mar;124(3):626-643. DOI: 10.1111/jam.13647
27. Teh CS, Chua KH, Lim YA, Lee SC, Thong KL. Loop-mediated isothermal amplification assay for detection of generic and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* among indigenous individuals in Malaysia. *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:457839. DOI: 10.1155/2014/457839
28. Chaouch M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An effective molecular point-of-care technique for the rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Rev Med Virol.* 2021 Nov;31(6):e2215. DOI: 10.1002/rmv.2215

Информация о соавторах:

Щит Ирина Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Баранова Евгения Владимировна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Волошин Александр Григорьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Бикетов Сергей Фёдорович, кандидат биологических наук, главный научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Irina Yu. Shchit, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher, Department of Immunobiology of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Evgenia V. Baranova, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher of Department of Immunobiology of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Alexandr G. Voloshin, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher, Laboratory of Nanobiotechnology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Sergey F. Biketov, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher of Department of Immunobiology of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

НОВОСТИ НАУКИ

Как микроорганизмы, обнаруженные в нашем кишечнике, могут усугублять опасные инфекции *Clostridioides difficile*

Clostridioides (ранее *Clostridium*) *difficile* – это бактерия, которая может вызывать потенциально смертельные инфекции, особенно у пожилых людей и людей, длительно принимающих антибиотики. Инфекции характеризуются диареей, тошнотой и лихорадкой. Возбудитель поражает более 350 тыс. американцев в год. После заражения пациенты склонны к повторному заражению.

Исследователи из University of Virginia School of Medicine определили, что группа устойчивых к антибиотикам «условно-патогенных» энтерококков, обнаруженных в кишечнике, называемых энтерококками, может сделать *C. difficile* более мощным и опасным.

Энтерококки – это бактерии, которые сами по себе могут вызывать опасные инфекции, трудно поддающиеся лечению: менингит, инфекции мочевыводящих путей (которые могут быть очень серьезными у пожилых людей), болезненный дивертикулит желудочно-кишечного тракта и др.

Энтерококки продуцируют аминокислоты, в том числе лейцин и орнитин, что делает *C. difficile* более серьезной угрозой для пациентов, состав кишечника которых был нарушен антибиотиками.

Мощные компьютерные модели помогли исследователям понять и предсказать сложные изменения в кишечнике. Установлено, что энтерококки могут резко изменить метаболизм в кишечнике, что в конечном итоге перепрограммирует клетки *C. difficile* и усилит их болезнетворное поведение.

Полагают, что, лучше поняв, как *C. difficile* взаимодействует с энтерококками и другими микроорганизмами в кишечнике, врачи смогут лучше бороться с этой распространенной и серьезной инфекцией.



Potentially deadly infection has dangerous ally lurking in our guts: Researchers reveal how gut bacteria put people at risk for severe *C. difficile* – ScienceDaily [Электронный ресурс]. URL: <https://www.sciencedaily.com/releases/2022/12/221221105755.htm>

Потенциал повышения чувствительности определения патогенов при сочетании магнитофоретической хроматографии и изотермической амплификации нуклеиновых кислот

С.Г.Игнатов, А.Г.Волошин, С.Ф.Бикетов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

В настоящее время микроскопия, иммуноанализ и молекулярная диагностика внесли огромный вклад в идентификацию возбудителей инфекционных заболеваний. Стандартный микробиологический подход, связанный с высевом образцов на питательные среды, является одним из лучших методов обнаружения патогенов. Однако сложная и трудоемкая процедура требует квалифицированных специалистов и длительна по времени выполнения. Как правило, для обнаружения возбудителей широко используются методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуноферментного анализа (ИФА). Однако для ПЦР требуется дорогостоящее аналитическое оборудование и дополнительная стадия очистки, а ИФА сталкивается с серьезными проблемами из-за дорогих антител, большего времени обнаружения и низкой чувствительности. Поэтому для повышения чувствительности предлагается использовать комбинацию нескольких подходов. Данный обзор посвящен сочетанию магнитофоретической хроматографии с изотермической амплификацией нуклеиновых кислот.

Ключевые слова: определение патогенов, магнитофоретическая хроматография, изотермическая амплификация нуклеиновых кислот

Для цитирования: Игнатов С.Г., Волошин А.Г., Бикетов С.Ф. Потенциал повышения чувствительности определения патогенов при сочетании магнитофоретической хроматографии и изотермической амплификации нуклеиновых кислот. Бактериология. 2022; 7(4): 74–78. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-74-78

Sensitivity potential for pathogen detection by combining magnetophoretic chromatography and isothermal nucleic acid amplification

S.G.Ignatov, A.G.Voloshin, S.F.Biketov

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

Immunoanalysis and molecular diagnostics have made a huge contribution to the identification of pathogens of infectious diseases at present, microscopy. The standard microbiological approach, involving inoculation of biological samples on culture media, is one of the best methods for pathogen detection. However, a complex and time-consuming procedure requires qualified specialists and a long time. As a rule, polymerase chain reaction (PCR) and enzyme immunoassay (ELISA) methods are widely used to detect pathogens. However, PCR requires expensive analytical equipment and an additional purification step, and ELISA has serious problems due to expensive antibodies, longer detection times, and low sensitivity. Therefore, to increase sensitivity, it is proposed to use a combination of several approaches. This review is devoted to the combination of magnetophoretic chromatography and isothermal amplification of nucleic acids.

Key words: detection of pathogens, magnetophoretic chromatography, isothermal amplification of nucleic acids

For citation: Ignatov S.G., Voloshin A.G., Biketov S.F. Sensitivity potential for pathogen detection by combining magnetophoretic chromatography and isothermal nucleic acid amplification. Bacteriology. 2022; 7(4): 74–78. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-74-78

Для корреспонденции:

Игнатов Сергей Георгиевич, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 360-773
E-mail: ignatov@obolensk.org

Статья поступила 09.11.2022 г., принята к печати 28.12.2022 г.

For correspondence:

Sergey G. Ignatov, PhD, DSc (Biological Sciences), Chief Researcher, Laboratory of Nanobiotechnology, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 360-773
E-mail: ignatov@obolensk.org

The article was received 09.11.2022, accepted for publication 28.12.2022

Быстрое и чувствительное обнаружение патогенных бактерий в различных образцах важно для предотвращения бактериальных заболеваний. При практическом применении методов идентификации микроорганизмов нужно учитывать, что большинство целевых патогенов находятся в сложных матрицах с примесями и, следовательно, необходима предварительная обработка исследуемого материала. Среди различных методов предварительной очистки, привлекает внимание предварительная обработка на основе магнитных наночастиц (МНЧ) оксида железа благодаря их уникальным свойствам, таким как высокая магнитная восприимчивость, суперпарамагнетизм и биосовместимость. После захвата бактерий-мишеней с помощью МНЧ, функционализированных распознающими молекулами, комплексы бактерии–МНЧ могут быть легко разделены и обогащены с помощью приложения внешнего магнитного поля. Рассмотрим последние достижения в области предварительной магнитной обработки патогенных бактерий.

Магнитофоретическая хроматография

Хотя многочисленные методы, разработанные на сегодняшний день, чувствительны и требуют лишь небольшого объема пробы, они не подходят для обнаружения патогенных бактерий в больших пробах с большим количеством биологического материала и жидкостей. При наличии небольшого количества возбудителя проведенный анализ может давать ложноотрицательный сигнал, если для обнаружения используется небольшой объем образца. Кроме того, наличие различных примесей в образцах может мешать обнаружению и снижать чувствительность. Чтобы преодолеть эти ограничения, требуется процесс предварительной обработки, который отделяет и концентрирует целевые бактерии. Фильтрация и центрифугирование являются традиционными методами предварительной обработки бактериальных растворов [1]. Эти методы широко используются во многих областях, потому что они просты, быстры и недороги. Однако фильтрация и центрифугирование включают несколько этапов концентрации и промывки целевых бактерий, что приводит к повреждению бактерий и потере образца. Кроме того, эти методы трудно интегрировать с методами обнаружения, что ограничивает автоматизацию всего процесса и производство портативных устройств. Из-за этих ограничений методы предварительной обработки на основе МНЧ привлекли значительное внимание как многообещающая альтернатива.

Магнитная сепарация в основном использует МНЧ оксида железа (Fe_3O_4) для разделения и обогащения мишеней благодаря их уникальным свойствам, включая высокую магнитную восприимчивость, суперпарамагнетизм и биосовместимость [2, 3]. При суперпарамагнетизме МНЧ можно разделить с помощью внешнего магнитного поля и повторно диспергировать без агрегации частиц [1, 4]. МНЧ можно легко функционализировать с помощью обработки поверхности, такой как реакция гидрохлорида карбодиимида/N-гидроксисукцинимидом и обработка силаном [5, 6]. Затем на обработанных поверхностях закрепляют распознающие молекулы, такие как полимеры, аптамеры и антитела [7–11]. Когда МНЧ, функционализированные молекулой распознавания, связаны с бактериями, комплексы бактерии–МНЧ можно разделить с помощью

постоянных магнитов с минимальным повреждением бактерий [11–15].

Кроме этого, для селективного захвата бактерий-мишени поверхности МНЧ функционализируют антителами и аптамерами. С помощью методов детекции, не требующих селективного разделения, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР), на поверхность МНЧ могут быть нанесены полиэлектролиты, способные к электростатическому связыванию с бактериями-мишенями [16]. Для выделения комплексов бактерий и МНЧ из растворов образцов с помощью внешнего магнитного поля в традиционном методе используется многостадийный процесс. После связывания МНЧ с бактериями-мишенями комплексы бактерии–МНЧ переносят на промывку и концентрирование.

После выделения комплексов бактерий с МНЧ из раствора образца для обнаружения целевых бактерий можно использовать различные устройства, такие как оптические, электрохимические датчики [17–19]. Наиболее чувствительные методы обнаружения предусматривают использование наночастиц золота, флуоресцентных красителей и квантовых точек [20, 21]. Однако после магнитной сепарации в растворе присутствуют как комплексы бактерий с МНЧ, так и свободные МНЧ, так как концентрация используемых МНЧ значительно превышает концентрацию целевых бактерий. Поскольку наличие свободных МНЧ мешает оптическим измерениям и снижает чувствительность обнаружения, были предприняты усилия по отделению комплексов бактерии–МНЧ от свободных МНЧ. После выделения комплексов бактерий с МНЧ из свободных МНЧ концентрацию бактерий можно определить с помощью хроматографии.

Хроматография представляет собой метод разделения смесей, растворенных в жидкости, и имеет широкое применение. Традиционная хроматография основана на различии сродства компонентов смеси к твердой неподвижной фазе, тогда как магнитофоретическая хроматография основана на различии скорости осаждения МНЧ разного размера во внешнем магнитном поле [22]. После всасывания смеси бактерий с комплексами МНЧ и свободных МНЧ в наконечник пипетки добавляют вязкий раствор полиэтиленоксида, образующий перемешанный жидкий слой. Поверхностное натяжение жидкости увеличивается с увеличением вязкости жидкости. Когда постоянный магнит помещается под наконечник пипетки, и комплексы бактерий с МНЧ, и свободные МНЧ испытывают силы магнитного поля, сопротивления и гравитации, поскольку они притягиваются к магниту. Магнитная сила пропорциональна кажущемуся объему МНЧ, что указывает на то, что скорость осаждения комплексов бактерий с МНЧ выше, чем у свободных МНЧ. В результате только комплексы бактерий с МНЧ с более высокой скоростью осаждения могут преодолевать поверхностное натяжение и достигать дна наконечника пипетки, а бактерии-мишени обнаруживаются глазами. Предел обнаружения магнитофоретической хроматографии в течение 10 мин составляет 100 КОЕ/мл.

Изотермическая амплификация нуклеиновых кислот

Методы изотермической амплификации являются альтернативой ПЦР, т.к. они относительно быстрее, проще в использовании и не требуют сложного оборудования. В частности,

петлевая изотермическая амплификация (LAMP) зарекомендовала себя как чувствительный, специфический и простой метод диагностики различных заболеваний, включая паразитарные болезни [23]. В процессе амплификации используются ДНК-полимераза с функцией смещения цепи и набор из четырех (шести) специально разработанных праймеров, которые распознают шесть (восемь) отдельных областей целевой ДНК [23, 24]. Амплификация и детекция целевого гена (из РНК или ДНК) проходит в один этап и при одной температуре в диапазоне 60–65°C. В течение менее чем 1 ч происходит синтез продукта на уровне примерно 10^9 копий целевой ДНК. Амплифицированные продукты состоят из ампликонов типа «петля-на-стебле» различной длины. Помимо электрофореза, их появление можно обнаружить визуально или нефело/фото/флуорометрически, как косвенно (по регистрации изменений концентраций пирофосфата, магния и протонов, которые происходят в ходе реакции синтеза ДНК, проявляемые металлоиндикаторами, комплексометрическими индикаторами, pH-индикаторами), так и прямо (по регистрации нарастания количества ампликонов, что возможно при использовании интеркалирующих красителей или флуоресцентно-меченных петлевых праймеров (FLOS-LAMP)) [25].

Амплификация и обнаружение нуклеиновой кислоты с использованием LAMP имеет много преимуществ по сравнению с неизотермическими методами, основанными на ПЦР. Во-первых, скорость усиления: используя соответствующий набор праймеров и оптимальные условия амплификации, можно обнаружить небольшое количество целевой нуклеиновой кислоты менее чем за 30 мин [26–28] по сравнению со временем амплификации до 3 ч для процесса ПЦР. Кроме того, настоятельно рекомендуется интеграция и использование LAMP в устройствах для оказания медицинской помощи из-за снижения потребности в энергии и техническом обслуживании [29–32].

Заключение

В настоящее время существует множество методов индикации и идентификации возбудителей инфекционных заболеваний, однако большинство из них требуют значительных затрат времени, специального оборудования и подготовленного персонала. Создание средств экспресс-идентификации возбудителей актуальных инфекций является насущной задачей.

На основании проделанного анализа для увеличения чувствительности определения патогенов представляется перспективным сочетание магнитофоретической хроматографии и изотермической амплификации нуклеиновых кислот (LAMP).

Информация о финансировании

Работа выполнена по НИОКР 1.1.13 в рамках государственного задания.

Financial support

The work was carried out within the framework of R&D 1.1.13 within the framework of the state assignment.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

- Li Z, Ma J, Ruan J, Zhuang X. Using Positively Charged Magnetic Nanoparticles to Capture Bacteria at Ultralow Concentration. *Nanoscale Res Lett*. 2019 Jun 4;14(1):195. DOI: 10.1186/s11671-019-3005-z
- Haun JB, Yoon TJ, Lee H, Weissleder R. Magnetic nanoparticle biosensors. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2010 May-Jun;2(3):291-304. DOI: 10.1002/wnan.84
- Shabestari Khiabani S, Farshbaf M, Akbarzadeh A, Davaran S. Magnetic nanoparticles: preparation methods, applications in cancer diagnosis and cancer therapy. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2017 Feb;45(1):6-17. DOI: 10.3109/21691401.2016.1167704
- Lim M-C, Park JY, Park K, Ok G, Jang H-J, Choi S-W. An automated system for separation and concentration of food-borne pathogens using immunomagnetic separation. *Food Control*. 2017;73:1541-7.
- Liu S, Yu B, Wang S, Shen Y, Cong H. Preparation, surface functionalization and application of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci*. 2020 Jul;281:102165. DOI: 10.1016/j.cis.2020.102165. Epub 2020 Apr 24. PMID: 32361408
- Wang L, Lin J. Recent advances on magnetic nanobead based biosensors: from separation to detection. *TrAC Trends Anal Chem*. 2020;128:115915.
- Lu H, Xu S. Ultrasensitive turn on molecularly imprinted fluorescence sensor for glycoprotein detection based on nanoparticles signal amplification. *Sens Actuat B Chem*. 2020;306:127566.
- Luo K, Park H, Adra HJ, Ryu J, Lee JH, Yu J, Choi SJ, Kim YR. Charge-switchable magnetic separation and characterization of food additive titanium dioxide nanoparticles from commercial food. *J Hazard Mater*. 2020 Jul 5;393:122483. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.122483
- Shen H, Wang J, Liu H, Li Z, Jiang F, Wang FB, Yuan Q. Rapid and Selective Detection of Pathogenic Bacteria in Bloodstream Infections with Aptamer-Based Recognition. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016 Aug 3;8(30):19371-8. DOI: 10.1021/acsami.6b06671
- Martynenko IV, Kusić D, Weigert F, Stafford S, Donnelly FC, Evstigneev R, et al. Magneto-Fluorescent Microbeads for Bacteria Detection Constructed from Superparamagnetic Fe₃O₄ Nanoparticles and AlS/ZnS Quantum Dots. *Anal Chem*. 2019 Oct 15;91(20):12661-12669. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b01812
- Varshney M, Yang L, Su XL, Li Y. Magnetic nanoparticle-antibody conjugates for the separation of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *J Food Prot*. 2005 Sep;68(9):1804-11. DOI: 10.4315/0362-028x-68.9.1804
- Vinayaka AC, Ngo TA, Kant K, Engelsmann P, Dave VP, Shahbazi MA, et al. Rapid detection of *Salmonella enterica* in food samples by a novel approach with combination of sample concentration and direct PCR. *Biosens Bioelectron*. 2019 Mar 15;129:224-230. DOI: 10.1016/j.bios.2018.09.078
- Xu H, Tang F, Dai J, Wang C, Zhou X. Ultrasensitive and rapid count of *Escherichia coli* using magnetic nanoparticle probe under dark-field microscope. *BMC Microbiol*. 2018 Sep 3;18(1):100. DOI: 10.1186/s12866-018-1241-5
- Yim C, Lee H, Lee S, Jeon S. One-step immobilization of antibodies on ZIF-8/Fe₃O₄ hybrid nanoparticles for the immunoassay of *Staphylococcus aureus*. *RSC Adv*. 2017;7(3):1418-22.
- Yang X, Zhou X, Zhu M, Xing D. Sensitive detection of *Listeria monocytogenes* based on highly efficient enrichment with vancomycin-conjugated brush-like magnetic nano-platforms. *Biosens Bioelectron*. 2017 May 15;91:238-245. DOI: 10.1016/j.bios.2016.11.044
- Lee H, Han H, Jeon S. Baleen-Mimicking Virtual Filters for Rapid Detection of Pathogenic Bacteria in Water Using Magnetic Nanoparticle Chains and a Halbach Ring. *ACS Sens*. 2020 Nov 25;5(11):3432-3437. DOI: 10.1021/acssensors.0c01334

17. Wang L, Huo X, Zheng L, Cai G, Wang Y, Liu N, et al. An ultrasensitive biosensor for colorimetric detection of *Salmonella* in large-volume sample using magnetic grid separation and platinum loaded zeolitic imidazolate Framework-8 nanocatalysts. *Biosens Bioelectron.* 2020 Feb 15;150:111862. DOI: 10.1016/j.bios.2019.111862
18. Nemr CR, Smith SJ, Liu W, Mephah AH, Mohamadi RM, Labib M, Kelley SO. Nanoparticle-Mediated Capture and Electrochemical Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Anal Chem.* 2019 Feb 19;91(4):2847-2853. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b04792
19. Sun X, Lei C, Guo L, Zhou Y. Separable detecting of *Escherichia coli* O157H:H7 by a giant magneto-resistance-based bio-sensing system. *Sens Actuat B Chem.* 2016;234:485-92.
20. Chen CX, Li YH, Zhou YL, Zhang JH, Wei QZ, Dai T, Wang L. Rapidly detecting antibiotics with magnetic nanoparticle coated CdTe quantum dots. *RSC Adv.* 2020 Jan 9;10(4):1966-1970. DOI: 10.1039/c9ra09894a
21. Chang Z-M, Wang Z, Shao D, et al. Fluorescent-magnetic Janus nanorods for selective capture and rapid identification of foodborne bacteria. *Sens Actuat B Chem.* 2018;260:1004-11.
22. Kwon D, Joo J, Lee J, Park KH, Jeon S. Magnetophoretic chromatography for the detection of pathogenic bacteria with the naked eye. *Anal Chem.* 2013 Aug 6;85(15):7594-8. DOI: 10.1021/ac401717f
23. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jun 15;28(12):E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63
24. Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, Hase T, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template. *Clin Chem.* 2001 Sep;47(9):1742-3.
25. Зубик АН, Рудницкая ГЕ, Евстапов АА. Изотермическая петлевая амплификация, LAMP в формате микроустройств. *Научное приборостроение.* 2021;31(1):3-43. DOI: 10.18358/np-31-1-1343
26. Rako L, Agarwal A, Semeraro L, Broadley A, Rodoni BC, Blacket MJ. A LAMP (loop-mediated isothermal amplification) test for rapid identification of Khapra beetle (*Trogoderma granarium*). *Pest Manag Sci.* 2021 Dec;77(12):5509-5521. DOI: 10.1002/ps.6591
27. Lee SH, Ahn G, Kim MS, Jeong OC, Lee JH, Kwon HG, et al. Poly-adenine-Coupled LAMP Barcoding to Detect Apple Scar Skin Viroid. *ACS Comb Sci.* 2018 Aug 13;20(8):472-481. DOI: 10.1021/acscombsci.8b00022
28. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Domínguez-Gil M, Belhassen-García M, Bellido JLM, Muro A. A Simple, Affordable, Rapid, Stabilized, Colorimetric, Versatile RT-LAMP Assay to Detect SARS-CoV-2. *Diagnostics (Basel).* 2021 Mar 4;11(3):438. DOI: 10.3390/diagnostics11030438
29. Zhang H, Xu Y, Fohlerova Z, Chang H, Iliescu C, Neuzil P. LAMP-on-a-chip: Revising microfluidic platforms for loop-mediated DNA amplification. *Trends Analyt Chem.* 2019 Apr;113:44-53. DOI: 10.1016/j.trac.2019.01.015
30. Augustine R, Hasan A, Das S, Ahmed R, Mori Y, Notomi T, Kevadiya BD, Thakor AS. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Rapid, Sensitive, Specific, and Cost-Effective Point-of-Care Test for Coronaviruses in the Context of COVID-19 Pandemic. *Biology (Basel).* 2020 Jul 22;9(8):182. DOI: 10.3390/biology9080182
31. Gao X, Sun B, Guan Y. Pullulan reduces the non-specific amplification of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Anal Bioanal Chem.* 2019 Feb;411(6):1211-1218. DOI: 10.1007/s00216-018-1552-2
32. Hsieh K, Mage PL, Csordas AT, Eisenstein M, Soh HT. Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP). *Chem Commun (Camb).* 2014 Apr 11;50(28):3747-9. DOI: 10.1039/c4cc00540f
2. Haun JB, Yoon TJ, Lee H, Weissleder R. Magnetic nanoparticle biosensors. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2010 May-Jun;2(3):291-304. DOI: 10.1002/wnan.84
3. Shabestari Khiabani S, Farshbaf M, Akbarzadeh A, Davaran S. Magnetic nanoparticles: preparation methods, applications in cancer diagnosis and cancer therapy. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2017 Feb;45(1):6-17. DOI: 10.3109/21691401.2016.1167704
4. Lim M-C, Park JY, Park K, Ok G, Jang H-J, Choi S-W. An automated system for separation and concentration of food-borne pathogens using immunomagnetic separation. *Food Control.* 2017;73:1541-7.
5. Liu S, Yu B, Wang S, Shen Y, Cong H. Preparation, surface functionalization and application of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci.* 2020 Jul;281:102165. DOI: 10.1016/j.cis.2020.102165. Epub 2020 Apr 24. PMID: 32361408
6. Wang L, Lin J. Recent advances on magnetic nanobead based biosensors: from separation to detection. *TrAC Trends Anal Chem.* 2020;128:115915.
7. Lu H, Xu S. Ultrasensitive turn on molecularly imprinted fluorescence sensor for glycoprotein detection based on nanoparticles signal amplification. *Sens Actuat B Chem.* 2020;306:127566.
8. Luo K, Park H, Adra HJ, Ryu J, Lee JH, Yu J, Choi SJ, Kim YR. Charge-switchable magnetic separation and characterization of food additive titanium dioxide nanoparticles from commercial food. *J Hazard Mater.* 2020 Jul 5;393:122483. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.122483
9. Shen H, Wang J, Liu H, Li Z, Jiang F, Wang FB, Yuan Q. Rapid and Selective Detection of Pathogenic Bacteria in Bloodstream Infections with Aptamer-Based Recognition. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016 Aug 3;8(30):19371-8. DOI: 10.1021/acsami.6b06671
10. Martynenko IV, Kusić D, Weigert F, Stafford S, Donnelly FC, Evstigneev R, et al. Magneto-Fluorescent Microbeads for Bacteria Detection Constructed from Superparamagnetic Fe₃O₄ Nanoparticles and AlS/ZnS Quantum Dots. *Anal Chem.* 2019 Oct 15;91(20):12661-12669. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b01812
11. Varshney M, Yang L, Su XL, Li Y. Magnetic nanoparticle-antibody conjugates for the separation of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *J Food Prot.* 2005 Sep;68(9):1804-11. DOI: 10.4315/0362-028x-68.9.1804
12. Vinayaka AC, Ngo TA, Kant K, Engelsmann P, Dave VP, Shahbazi MA, et al. Rapid detection of *Salmonella enterica* in food samples by a novel approach with combination of sample concentration and direct PCR. *Biosens Bioelectron.* 2019 Mar 15;129:224-230. DOI: 10.1016/j.bios.2018.09.078
13. Xu H, Tang F, Dai J, Wang C, Zhou X. Ultrasensitive and rapid count of *Escherichia coli* using magnetic nanoparticle probe under dark-field microscope. *BMC Microbiol.* 2018 Sep 3;18(1):100. DOI: 10.1186/s12866-018-1241-5
14. Yim C, Lee H, Lee S, Jeon S. One-step immobilization of antibodies on ZIF-8/Fe₃O₄ hybrid nanoparticles for the immunoassay of *Staphylococcus aureus*. *RSC Adv.* 2017;7(3):1418-22.
15. Yang X, Zhou X, Zhu M, Xing D. Sensitive detection of *Listeria monocytogenes* based on highly efficient enrichment with vancomycin-conjugated brush-like magnetic nano-platforms. *Biosens Bioelectron.* 2017 May 15;91:238-245. DOI: 10.1016/j.bios.2016.11.044
16. Lee H, Han H, Jeon S. Baleen-Mimicking Virtual Filters for Rapid Detection of Pathogenic Bacteria in Water Using Magnetic Nanoparticle Chains and a Halbach Ring. *ACS Sens.* 2020 Nov 25;5(11):3432-3437. DOI: 10.1021/acssensors.0c01334
17. Wang L, Huo X, Zheng L, Cai G, Wang Y, Liu N, et al. An ultrasensitive biosensor for colorimetric detection of *Salmonella* in large-volume sample using magnetic grid separation and platinum loaded zeolitic imidazolate Framework-8 nanocatalysts. *Biosens Bioelectron.* 2020 Feb 15;150:111862. DOI: 10.1016/j.bios.2019.111862
18. Nemr CR, Smith SJ, Liu W, Mephah AH, Mohamadi RM, Labib M, Kelley SO. Nanoparticle-Mediated Capture and Electrochemical Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Anal Chem.* 2019 Feb 19;91(4):2847-2853. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b04792

References

1. Li Z, Ma J, Ruan J, Zhuang X. Using Positively Charged Magnetic Nanoparticles to Capture Bacteria at Ultralow Concentration. *Nanoscale Res Lett.* 2019 Jun 4;14(1):195. DOI: 10.1186/s11671-019-3005-z

19. Sun X, Lei C, Guo L, Zhou Y. Separable detecting of *Escherichia coli* O157H:H7 by a giant magneto-resistance-based bio-sensing system. *Sens Actuat B Chem.* 2016;234:485-92.
20. Chen CX, Li YH, Zhou YL, Zhang JH, Wei QZ, Dai T, Wang L. Rapidly detecting antibiotics with magnetic nanoparticle coated CdTe quantum dots. *RSC Adv.* 2020 Jan 9;10(4):1966-1970. DOI: 10.1039/c9ra09894a
21. Chang Z-M, Wang Z, Shao D, et al. Fluorescent-magnetic Janus nanorods for selective capture and rapid identification of foodborne bacteria. *Sens Actuat B Chem.* 2018;260:1004-11.
22. Kwon D, Joo J, Lee J, Park KH, Jeon S. Magnetophoretic chromatography for the detection of pathogenic bacteria with the naked eye. *Anal Chem.* 2013 Aug 6;85(15):7594-8. DOI: 10.1021/ac401717f
23. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jun 15;28(12):E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63
24. Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, Hase T, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template. *Clin Chem.* 2001 Sep;47(9):1742-3.
25. Zubik AN, Rudnitskaya GE, Evstravov AA. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique in microdevice format (review). *Nauchnoe Priborostroyeniye.* 2021;31(1):3-43. DOI: 10.18358/np-31-1-i343 (In Russian).
26. Rako L, Agarwal A, Semeraro L, Broadley A, Rodoni BC, Blacket MJ. A LAMP (loop-mediated isothermal amplification) test for rapid identification of Khapra beetle (*Trogoderma granarium*). *Pest Manag Sci.* 2021 Dec;77(12):5509-5521. DOI: 10.1002/ps.6591
27. Lee SH, Ahn G, Kim MS, Jeong OC, Lee JH, Kwon HG, et al. Poly-adenine-Coupled LAMP Barcoding to Detect Apple Scar Skin Viroid. *ACS Comb Sci.* 2018 Aug 13;20(8):472-481. DOI: 10.1021/acscombsci.8b00022
28. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Domínguez-Gil M, Belhassen-García M, Bellido JLM, Muro A. A Simple, Affordable, Rapid, Stabilized, Colorimetric, Versatile RT-LAMP Assay to Detect SARS-CoV-2. *Diagnostics (Basel).* 2021 Mar 4;11(3):438. DOI: 10.3390/diagnostics11030438
29. Zhang H, Xu Y, Fohlerova Z, Chang H, Iliescu C, Neuzil P. LAMP-on-a-chip: Revising microfluidic platforms for loop-mediated DNA amplification. *Trends Analyt Chem.* 2019 Apr;113:44-53. DOI: 10.1016/j.trac.2019.01.015
30. Augustine R, Hasan A, Das S, Ahmed R, Mori Y, Notomi T, Kevadiya BD, Thakor AS. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Rapid, Sensitive, Specific, and Cost-Effective Point-of-Care Test for Coronaviruses in the Context of COVID-19 Pandemic. *Biology (Basel).* 2020 Jul 22;9(8):182. DOI: 10.3390/biology9080182
31. Gao X, Sun B, Guan Y. Pullulan reduces the non-specific amplification of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Anal Bioanal Chem.* 2019 Feb;411(6):1211-1218. DOI: 10.1007/s00216-018-1552-2
32. Hsieh K, Mage PL, Csordas AT, Eisenstein M, Soh HT. Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP). *Chem Commun (Camb).* 2014 Apr 11;50(28):3747-9. DOI: 10.1039/c4cc00540f

Информация о соавторах:

Волошин Александр Григорьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Бикетов Сергей Фёдорович, кандидат биологических наук, главный научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Alexandr G. Voloshin, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher, Laboratory of Nanobiotechnology, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Sergey F. Biketov, PhD (Biological Science), Leading Researcher of Department of Immunobiology of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

НОВОСТИ НАУКИ

Новое оружие против устойчивых к антибиотикам бактерий

Klebsiella pneumoniae является возбудителем ряда тяжелых инфекций. Многие штаммы *K. pneumoniae* устойчивы ко многим антибиотикам, и эта ситуация создает потребность в новых антибактериальных молекулах. Патогенность *K. pneumoniae* во многом зависит от ее способности избегать фагоцитоза и внутриклеточного уничтожения фагоцитирующими клетками. Вмешательство в эти механизмы побега может позволить снизить вирулентность бактерий и бороться с инфекциями. В исследовании использован *Dictyostelium discoideum* в качестве модельного фагоцита для скрининга коллекции из 1099 химических соединений. Клетки Phg1A KO *D. discoideum* не могут питаться бактериями *K. pneumoniae*, если только бактерии не несут мутации, снижающие их вирулентность. Идентифицировали 3 неантибиотических соединения, которые восстанавливали рост клеток phg1A KO на *K. pneumoniae*, и охарактеризовали механизм действия одного из них, 5-этил-2'-дезоксисуридина (K2). Бактерии, обработанные K2, быстрее погибали в фагосомах *D. discoideum*, чем необработанные бактерии. Они были более чувствительны к полимиксину, а их внешняя мембрана была более доступна для гидрофобного флуоресцентного зонда. Эти результаты предполагают, что K2 действует, делая мембрану *K. pneumoniae* доступной для антибактериальных эфффекторов. K2 был эфффективен в отношении трех различных штаммов *K. pneumoniae* и действовал при таких низких концентрациях, как 3 мкМ. K2 ранее использовался для лечения вирусных инфекций, но его точный молекулярный механизм действия на *K. pneumoniae* еще предстоит определить.



Ifrid E., et al.

5-ethyl-2'-deoxyuridine fragilizes *Klebsiella pneumoniae* outer wall and facilitates intracellular killing by phagocytic cells. *Plos One.* 2022;10(17):e0269093.

Методы диагностики малярии

И.Ю.Щит, С.Ф.Бикетов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,
Оболенск, Московская область, Российская Федерация

В статье рассматривается и подчеркивается важность точных, чувствительных и доступных диагностических методов в борьбе с малярией. Используемые в настоящее время методы диагностики включают микроскопию, экспресс-тесты (быстрый диагностический тест) и полимеразную цепную реакцию. Обсуждаются развивающиеся перспективные методы на основе амплификации нуклеиновых кислот, такие как петлевая изотермическая амплификация (LAMP), амплификация, основанная на последовательности нуклеиновых кислот (NASBA), термофильная хеликаза-зависимая амплификация (tHDA), амплификация нуклеиновых кислот в слюне и моче. Несмотря на растущее число ложноотрицательных результатов, диагностические экспресс-тесты по-прежнему широко применяются, поскольку они просты в использовании, быстрые и не требуют дорогостоящего оборудования. Подчеркивается важность разработки простых высокоточных методов, особенно для стран с ограниченными ресурсами.

Ключевые слова: петлевая изотермическая амплификация, LAMP, малярия, Plasmodium

Для цитирования: Щит И.Ю., Бикетов С.Ф. Методы диагностики малярии. Бактериология. 2022; 7(4): 79–84. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-79-84

Methods of malaria diagnostics

I.Yu.Shchit, S.F.Biketov

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

This article addresses and emphasizes the importance of accurate, sensitive and immediately available diagnostic methods to fight malaria. Currently used diagnostics methods include microscope examination, rapid diagnostic test (RDT) and polymerase chain reaction (PCR). The article discusses new perspective methods under development, that are based on the amplification of nucleic acids such as Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification), Thermophilic Helicase-Dependent Amplification (tHDA), amplification of nucleic acids in saliva and urine. Despite the growing number of false-negative results, rapid diagnostic tests are still used extensively because they are easy to use, fast and do not require expensive equipment. The article emphasizes the importance of development of easy-to-use and highly accurate methods especially for countries with limited resources.

Key words: loop mediated isothermal amplification, LAMP, malaria, Plasmodium

For citation: Shchit I.Yu., Biketov S.F. Methods of malaria diagnostics. Bacteriology. 2022; 7(4): 79–84. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-79-84

На протяжении веков люди страдали от малярии, болезни, которая, кажется, сильнее стратегий, применяемых для борьбы с ней. Возникающая устойчивость к противомалярийным препаратам и инсектицидам, используемым для борьбы с переносчиками, продолжает сдерживать прогресс в борьбе с малярией. Заражение происходит через укусы самки комара рода *Anopheles*, которая является компетентным переносчиком для передачи одноклеточного простейшего из рода *Plasmodium* человеку-хозяину. Паразит не причиняет вреда комару, а широкий ареал обитания насеко-

мого обеспечивает трансмиссивность болезни. Малярия относится к числу самых распространенных инфекций во всем мире и является одной из основных причин смертности. Согласно отчету Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) о малярии за 2021 г., во всем мире было зарегистрировано 241 млн случаев и 627 тыс. смертельных исходов заболевания [1]. Вероятность заражения малярией и развития тяжелой формы болезни значительно выше среди некоторых групп населения: младенцев, детей в возрасте до пяти лет, беременных женщин и лиц с ВИЧ/СПИДом, а также

Для корреспонденции:

Щит Ирина Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0065
E-mail: irina_shchit@mail.ru

Статья поступила 22.11.2022 г., принята к печати 28.12.2022 г.

For correspondence:

Irina Yu. Shchit, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0065
E-mail: irina_shchit@mail.ru

The article was received 22.11.2022, accepted for publication 28.12.2022

лиц с низким уровнем иммунитета, прибывающих в районы с интенсивной передачей малярии, в частности трудящихся-мигрантов, мобильных групп населения и лиц, совершающих поездки.

Страны, где малярия распространена, называют «поясом малярии», в основном это страны с тропическим климатом, который способствует размножению комаров и, как следствие, передаче паразита человеку.

Малярию у людей вызывают 5 видов представителей рода *Plasmodium*. *P. falciparum* является причиной тропической малярии и самым смертоносным паразитом. На его долю приходится 99,7% заболеваний в странах Африки к югу от Сахары. Трехдневную малярию провоцирует *P. vivax*, он наиболее распространен в Америке. 75% случаев заражения обусловлены этим видом плазмодия [1]. *P. malariae* и *P. ovale* распространены повсеместно, однако обусловленные ими четырехдневная малярия и малярия овале соответственно не вызывают таких тяжелых состояний, как тропическая малярия [2]. *P. knowlesi* поражает обычно длиннохвостых и свинохвостых макаков. Тем не менее в Юго-Восточной Азии были зарегистрированы случаи заражения человека *P. knowlesi* [3].

Успех лечения малярии зависит от своевременной диагностики и выбора наиболее подходящей схемы терапии. Для лечения неосложненной формы малярии, вызванной *P. falciparum*, ВОЗ рекомендует комбинированную терапию на основе артемизинина (АКТ), а при малярии, вызванной *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* и *P. knowlesi* – лечение АКТ или хлорохином. Для предотвращения рецидивов *P. vivax* и *P. ovale* рекомендуется примахин [4].

Малярия – острое лихорадочное заболевание, клинические симптомы неосложненной формы малярии включают чувство общего недомогания, общую слабость, лихорадку, головные и мышечные боли, желудочно-кишечный дискомфорт, тошноту и рвоту [5]. Первые симптомы малярии – лихорадка, головная боль и озноб – обычно появляются через 10–15 дней после укуса инфицированного комара и могут быть слабо выраженными, что затрудняет выявление малярии. При отсутствии лечения малярия, вызванная *P. falciparum*, может в течение 24 ч развиться в тяжелую форму и привести к летальному исходу.

Чтобы дифференцировать малярию от других заболеваний, необходимы специальные методы диагностики. Ранняя диагностика может предотвратить дальнейшее развитие инфекции и снизить тяжесть заболевания, особенно в случае детей в возрасте до 5 лет, на долю которых в 2020 г. приходилось около 77% смертельных случаев от тяжелой малярии во всем мире. Эффективное лечение малярии зависит от вида плазмодия и паразитарной нагрузки. Точные и доступные диагностические инструменты жизненно важны для выявления бессимптомных инфекций, контроля и ликвидации малярии, а также для программ, направленных на глобальную ликвидацию малярии.

Методы диагностики малярии

Микроскопическое исследование толстой капли и мазков крови

Микроскопическое исследование толстых и тонких мазков крови является золотым стандартом для выявления па-

разита в крови и определения соответствующего лечения. Этот метод диагностики заболевания наиболее распространен. Кровь у пациента берут из пальца или из вены. Кровь от больных необходимо брать до начала лечения и несколько раз во время лечения. Для исследования крови от каждого больного готовят 4–8 препаратов (мазки и толстые капли), которые окрашивают по методу Романовского–Гимзы. Ядра паразитов окрашиваются в красный, а цитоплазма – в синеголубой цвет. В эритроцитах обнаруживают различные стадии возбудителя малярии: кольцевидные трофозоиты, амёбовидные трофозоиты (взрослые формы), зрелые трофозоиты (шизонты) и незрелые мужские и женские половые клетки – микро- и макрогаметоциты. Для определения вида малярийных плазмодиев необходимо уметь дифференцировать их морфологические особенности. Сначала просматривают толстые капли. Если в них плазмодиев не выявляют, тонкие мазки крови вообще не исследуют. И только при наличии паразитов в толстой капле особенности их строения изучают в тонких мазках. Чувствительность и специфичность этого метода составляют 95 и 98% соответственно. Предел обнаружения для микроскопического исследования составляет примерно 50–200 паразитов в 1 мкл крови [6]. Опытный лаборант может определить уровень паразитемии в мазке крови примерно в течение 1 ч.

Исследование мазка крови под микроскопом позволяет определить уровень паразитемии, морфологию и вид паразитов. Для проведения микроскопического анализа требуются микроскоп и квалифицированный персонал, а точность и быстрота анализа будут зависеть от квалификации медицинского работника. Метод не позволяет выявить возбудителя у бессимптомных пациентов с низкой паразитемией. Такие пациенты остаются невылеченными и способствуют дальнейшему распространению инфекции.

Экспресс-диагностический тест на антиген малярии

Быстрый диагностический тест (БДТ) предназначен для обнаружения антигенов малярийного плазмодия и представляет собой иммунохроматографическую полоску, на один конец которой капают кровь, а результат анализа проявляется в виде линий на поверхности полоски [7]. С помощью этого теста определяют три типа антигенов плазмодия: богатый гистицином белок 2 (pHRP-2), лактатдегидрогеназу (pLDH) и альдолазу. pHRP-2 специфичен для *P. falciparum*, а лактатдегидрогеназа и альдолаза обнаружены у всех видов *Plasmodium* [8]. Более 90% коммерчески доступных тестов определяют pHRP-2 [9]. Когда смесь крови и буфера мигрирует по диагностической полоске, антитела, иммобилизованные на поверхности тест-полоски, связываются с антигенами паразита, и в этой зоне появляется окрашенная линия. Каждый экспресс-тест имеет положительный контроль, указывающий на достоверность анализа. Имеющиеся в настоящее время видоспецифичные экспресс-тесты способны идентифицировать только 2 вида: *P. falciparum* и *P. vivax* [10]. В случае других представителей рода *Plasmodium* тесты показывают наличие паразита, но видовую принадлежность определить не способны.

ВОЗ в сотрудничестве с Фондом для инновационных и новых диагностических средств (FIND), центрами по контролю и профилактике заболеваний, а также другими организа-

циями провела проверку различных коммерчески доступных экспресс-тестов. Для закупки БДТ рекомендуется ориентироваться на рекомендации ВОЗ, по критериям которой эффективность тестов каждого производителя оценивается с помощью коэффициента детекции [11]. ВОЗ рекомендует проводить профилактическую и последующую послепродажную проверку, чтобы удостовериться, что каждая партия тестов соответствует стандарту [12]. Чувствительность БДТ колеблется от 85 до 94,8%, а специфичность – от 95,2 до 99% [13, 14]. Предел обнаружения сравним с микроскопией – 50–100 паразитов в 1 мкл крови, а обученный персонал может провести анализ и получить результат через 15–20 мин с момента забора крови [5]. БДТ привлекательны в плане невысокой стоимости. В настоящее время разрабатывается сверхчувствительный экспресс-тест, чувствительность которого может быть в 10 раз выше, чем у используемых в настоящее время БДТ; предполагается, что тест будет способен обнаруживать заболевание на более ранней стадии [8].

Экспресс-тесты представляют собой быстрый и доступный метод диагностики малярии [5]. Их легко можно использовать в труднодоступных районах и странах с ограниченными ресурсами. Выполнить тест способен средний медицинский персонал, медико-санитарные работники могут провести анализ в местных медпунктах, затем назначить лечение или направить пациентов в медицинские центры. К недостаткам метода можно отнести растущее число ложноотрицательных результатов, которые возникают из-за делеции в гене *pHRP-2* малярийного плазмодия, а также из-за феномена «прозоны» у пациентов с высоким уровнем паразитемии [7]. Разработка новых экспресс-тестов не поспевает за постоянно меняющейся природой малярийного паразита. Кроме того, метод не позволяет определить паразитарную нагрузку в крови больных и, следовательно, затрудняет контроль эффективности терапии. К существенным недостаткам относится низкая чувствительность тестов, не позволяющая выявить бессимптомных носителей. Ложноположительные результаты возникают из-за того, что *pHRP-2* может оставаться в крови до 30 дней от начала лечения [7].

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Методы на основе ПЦР определяют наличие генов-мишеней малярии в образце крови. Существуют различные модификации этого метода, в том числе гнездовая ПЦР (nested ПЦР), мультиплексная ПЦР с детекцией продукта в режиме реального времени и ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [15]. В основном мишенью для детекции малярийного паразита служат гены 18S рРНК [16]. ПЦР позволяет выявить бессимптомных пациентов в случаях, когда с помощью микроскопии и экспресс-тестов найти возбудителя малярии не удалось. Чувствительность и специфичность различных модификаций ПЦР колеблется от 98 до 100% по сравнению с микроскопией [17], а предел обнаружения составляет 0,5–5 паразитов в 1 мкл крови [16].

С помощью гнездовой ПЦР удалось выявить генетические последовательности малярийного плазмодия в слюне. Мишенями послужили 18S рРНК *Plasmodium* или ген дигидрофолатредуктазы *P. falciparum*. Гнездовая ПЦР состоит из двух последовательных раундов ПЦР с использованием двух наборов праймеров. Продукт первого раунда ПЦР слу-

жит матрицей для второго [18]. Для проведения гнездовой ПЦР также требуется термоциклер, предварительно ДНК нужно выделить из образца слюны. Чувствительность и специфичность этого метода колеблется от 86,36 до 95%. Специфичность колеблется от 93 до 98,4% по сравнению с микроскопией [18, 19]. Предел обнаружения для этого метода составляет 1–10 паразитов/мкл крови [20].

Анализ с помощью ПЦР обычно выполняется за 2–3 ч, и, не считая первоначальной стоимости термоциклера и другого оборудования, стоимость одного ПЦР-анализа примерно в 10 раз превышает стоимость экспресс-теста [21]. Высокая стоимость анализа и оборудования, необходимость квалифицированного персонала делают метод ПЦР дорогим и труднодоступным для небольших больниц и медпунктов, а также практически неосуществимым в полевых условиях. Гнездовая ПЦР длится около 6 ч, т.к. включает 2 раунда. Стоимость теста будет примерно равна стоимости ПЦР-анализа крови.

Новые развивающиеся методы диагностики малярии

Метод изотермической амплификации нуклеиновых кислот NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification)

NASBA – метод амплификации молекул рибосомальной РНК. В его основе лежит обнаружение специфического фрагмента РНК в присутствии ДНК с помощью двух специфических праймеров и трех ферментов: обратной транскриптазы (ревертазы), РНКазы H и T7 РНК-полимеразы [21]. С РНК-мишени с помощью обратной транскриптазы синтезируется комплементарная ДНК (кДНК), а затем с кДНК с помощью T7 РНК-полимеразы амплифицируется целевая мишень [16]. Для проведения NASBA не требуется термоциклер, реакция проводится при 41°C, при этом амплификация целевой последовательности РНК увеличивается в 108 раз. Чувствительность метода по сравнению с микроскопией колеблется от 97,40 до 100%, а специфичность – от 80,90 до 94% [18]. Предел обнаружения составляет 0,01–0,1 паразита/мкл крови. Процедура NASBA занимает около 1 ч, стоимость анализа в 3–4 раза выше стоимости ПЦР-исследования [16].

Отсутствие необходимости использовать термоциклер и высокая чувствительность – преимущества метода NASBA. Однако для его проведения нужен грамотный персонал, а стоимость одного теста выше, чем у других методов детекции возбудителя малярии.

Изотермическая термофильная хеликаза-зависимая амплификация (tHDA)

В случае tHDA двухцепочечная ДНК расплетается при помощи хеликазы, а белки, связывающие одноцепочечную ДНК, связывают разделенные цепи и предотвращают комплементарное спаривание. После отжига специфических праймеров на одиночных цепях ДНК-полимераза синтезирует новые цепи. Реакцию проводят при 65°C около 2 ч [21]. Рибосомальная РНК (18S рРНК) амплифицируется непосредственно из цельной крови без денатурации нуклеиновой кислоты. По завершении tHDA ампликоны гибридизуют с зондами, мечеными либо флуоресцеином (FAM), либо дигоксигенином (DIG), а продукт амплификации выявляют на иммунохроматографических полосках, которые содержат антитела против FAM или DIG. Чувствительность и специ-

фичность этого метода составляют 96,6 и 100% соответственно по сравнению с микроскопией [22]. Предел обнаружения составляет 200 паразитов/мкл крови, а результат анализа можно получить через 1–2 ч [21, 22].

Рекомбиназная полимеразная амплификация (RPA)

RPA является одним из методов изотермической амплификации, которая протекает при фиксированной температуре от 37°C до 42°C, без пробоподготовки реакция осуществляется за 20 мин [23]. Продукт амплификации, как и в случае tHDA, можно выявить с использованием иммунохроматографических полосок. В перспективе RPA предполагается применять в качестве экспресс-анализа на месте, особенно в условиях малооснащенных лабораторий.

Описано применение метода RPA с обратной транскрипцией (RT-RPA) для выявления *P. falciparum* [24]. В качестве матрицы послужили обильно экспрессирующиеся на бесполой стадии гены 28S рРНК на хромосомах 5 и 7. Для детекции продукта амплификации использовали иммунохроматографические полоски. Диагностическую эффективность оценивали у добровольцев после контролируемого заражения человека малярией (CHMI) криоконсервированными спорозитами *P. falciparum* (Sanaria PfSPZ). Метод был также опробован в Ламбарене (Республика Габон) для оценки бессимптомных лиц из эндемичных районов по малярии. RT-RPA показал себя надежным диагностическим тестом при выявлении бессимптомной инфекции с низким уровнем паразитемии. Его можно использовать в тех местах, где сверхчувствительную количественную ОТ-ПЦР провести невозможно. Однако метод требует существенной оптимизации. Создатели теста отметили возможную контаминацию рабочей зоны ампликонами и уменьшение чувствительности при использовании иммунохроматографических полосок.

Петлевая изотермическая амплификация (LAMP)

Петлевая изотермическая амплификация – это относительно новый метод амплификации нуклеиновых кислот, впервые описанный в 2000 г. [25]. LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) представляет собой самоповторяющийся синтез ДНК со смещением цепи, осуществляемый с помощью фермента Bst-полимеразы. Продуктами амплификации являются структуры ДНК типа «петля-на-стебле» с инвертированными повторами фрагмента гена-мишени, формирующими в пространстве структуры, похожие на цветную капусту. Особенность метода в том, что реакция амплификации протекает в изотермических условиях (60–65°C), этап денатурации ДНК отсутствует. В реакции используется от 4 до 6 праймеров, комплементарных 6–8 участкам на мишени, поэтому специфичность амплификации очень высокая. Амплифицированного продукта синтезируется так много, что его можно обнаружить визуально по появлению мутности вследствие образования побочного продукта реакции пирофосфата магния. В течение 15–60 мин амплификации количество фрагмента ДНК-мишени увеличивается в 10^9 раз. Продукт реакции можно обнаружить с помощью электрофореза по появлению в геле характерной лестницы полос, т.к. в ходе LAMP образуются ДНК-конкатемеры кратной длины, или по флуоресценции при добавлении в реакционную смесь интеркалирующих красителей (кальцеин, SYBR Green, бро-

мистый этидий, пропидиум йодид, PicoGreen и др.). Следить за изменением флуоресценции окрашенной реакционной смеси можно прямо в ходе реакции с помощью реал-тайм-амплификатора или специального реал-тайм-флуориметра для LAMP [18, 22]. Для реал-тайм-LAMP можно использовать различные варианты флуоресцентных зондов на основе внутренних праймеров. В частности, для мультиплексной реал-тайм-LAMP были предложены DARQ-зонды [26].

LAMP обладает высокой чувствительностью с пределом обнаружения 0,2–5 паразитов/мкл образца, стоимость теста эквивалентна рыночной стоимости экспресс-тестов на антиген. Отсутствие этапа выделения нуклеиновых кислот и возможность синтеза 109 копий ДНК делают этот метод более эффективным, чем NASBA, tHDA и RPA. LAMP можно легко адаптировать к полевым условиям без применения дорогостоящего оборудования, провести анализ способен обычный лаборант, он подходит для малооснащенных лабораторий. Необходимость в выделении ДНК отсутствует, реакция будет хорошо идти даже при использовании плохо очищенной ДНК или необработанного образца [27]. Есть сообщения, что в реакции использовали образцы спинномозговой жидкости, термически обработанной крови [28] и сыворотки.

LAMP-анализ был использован для обнаружения *Plasmodium* spp. в крови с высокой чувствительностью и специфичностью [29–34]. Сообщается, что метод LAMP применим для неинвазивного обнаружения *P. vivax* и *P. falciparum* в образцах слюны и мочи [35, 36]. В настоящее время на рынке доступны 2 коммерческих набора для детекции малярии: «LoopAmp malaria (Pan/Pf) detection kit» (Eiken Chemical Company, Япония) и «Illumigene malaria LAMP assay» (Meridian Biosciences, США). Результаты тестирования «LoopAmp malaria (Pan/Pf) detection kit» показали многообещающим. Данный тест в полевых условиях был способен выявить ДНК возбудителя малярии в образцах из фильтровальной бумаги при низком уровне паразитемии [37, 38].

Заключение

Основной проблемой в достижении ликвидации малярии в эндемичных районах является ограниченность ресурсов в этих областях. По критериям, установленным ВОЗ для идеального диагностического теста при использовании в странах с ограниченными ресурсами, тест должен быть: недорогим, чувствительным, специфичным, удобным для пользователя, надежным, экспрессным, не требующим оборудования и легко используемым в любых климатических условиях [16, 39].

Хотя многие методы диагностики малярии соответствуют одному или нескольким критериям идеального диагностического теста по рекомендациям ВОЗ, ни один из них не отвечает всем пунктам. Микроскопический метод зависит от электричества и требует опытного микроскописта. Экспресс-диагностические тесты на антиген малярии проводятся быстро, не зависят от электричества, имеют невысокую стоимость, но из-за низкой чувствительности не способны выявить бессимптомных носителей малярии, а также не выявляют мутантных паразитов с делецией гена *pHRP-2*. ПЦР обладает высокими чувствительностью и специфичностью, но требует надежного электроснабжения, хорошего прибороснащения, высококвалифицированного персонала, а стоимость ПЦР-анализа больше, чем у микроскопии и экспресс-

тестов. Зависимость ПЦР от термоциклера и выделения ДНК остается проблемой в условиях ограниченных ресурсов. Новые методы диагностики, некоторые из которых находятся в стадии разработки, также должны будут соответствовать всем критериям идеального теста ВОЗ, чтобы способствовать успеху в лечении и возможной ликвидации малярии. Этим требованиям удовлетворяют методы изотермической амплификации. И среди них LAMP заслуживает особенного внимания, так как является хорошим и эффективным диагностическим методом для развивающихся стран, поскольку не требует сложного оборудования и квалифицированного персонала и поэтому экономически более выгоден. В соответствии с Глобальной программой по борьбе с малярией ВОЗ рекомендует использовать в качестве диагностического средства именно тесты на основе петлевой изотермической амплификации [40], особенно для диагностики малярии в странах с ограниченными ресурсами.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was supported by the Sectoral Scientific Program of the Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература / References

- World malaria report 2021. URL: <https://www.who.int/publications/item/9789240040496> (accessed 20.11.2022).
- Ashley EA, Pyae Phyo A, Woodrow CJ. Malaria. *Lancet*. 2018 Apr 21;391(10130):1608-1621. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30324-6
- Singh B, Daneshvar C. Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clin Microbiol Rev*. 2013 Apr;26(2):165-84. DOI: 10.1128/CMR.00079-12
- World Health Organization Guidelines for the treatment of malaria. World Health Organization, 3rd ed. Geneva: World Health Organization, 2015. 313 p.
- White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *Lancet*. 2014 Feb 22;383(9918):723-35. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60024-0
- Kolluri N, Klapperich CM, Cabodi M. Towards lab-on-a-chip diagnostics for malaria elimination. *Lab on a Chip*. 2017 Dec;18(1):75-94. DOI: 10.1039/c7lc00758b.
- Wilson ML. Malaria rapid diagnostic tests. *Clin Infect Dis*. 2012 Jun;54(11):1637-41. DOI: 10.1093/cid/cis228
- Amir A, Cheong FW, De Silva JR, Lau YL. Diagnostic tools in childhood malaria. *Parasit Vectors*. 2018 Jan 23;11(1):53. DOI: 10.1186/s13071-018-2617-y
- Mouatcho JC, Goldring JPD. Malaria rapid diagnostic tests: challenges and prospects. *J Med Microbiol*. 2013 Oct;62(Pt 10):1491-1505. DOI: 10.1099/jmm.0.052506-0.
- Mukkala AN, Kwan J, Lau R, Harris D, Kain D, Boggild AK. An Update on Malaria Rapid Diagnostic Tests. *Curr Infect Dis Rep*. 2018 Oct 23;20(12):49. DOI: 10.1007/s11908-018-0655-4
- World Health Organization Malaria rapid diagnostic test performance: summary results of WHO product testing of malaria RDTs: round 1–7 (2008–2016) / World Health Organization. Geneva: World Health Organization, 2017, 33 p.
- Cunningham J, Jones S, Gatton ML, Barnwell JW, Cheng Q, Chiodini PL, et al. A review of the WHO malaria rapid diagnostic test product testing programme (2008–2018): Performance, procurement and policy. *Malar J* 18, 387 (2019). DOI: 10.1186/s12936-019-3028-z
- Pham NM, Karlen W, Beck HP, Delamarche E. Malaria and the 'last' parasite: How can technology help? *Malar J* 17, 260 (2018). DOI: 10.1186/s12936-018-2408-0
- Abba K, Deeks JJ, Olliaro P, Naing CM, Jackson SM, Takwoingi Y, Donegan S, Garner P. Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated *P. falciparum* malaria in endemic countries. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011 Jul 6;2011(7):CD008122. DOI: 10.1002/14651858.CD008122.pub2
- Vasoo S, Pritt BS. Molecular diagnostics and parasitic disease. *Clin Lab Med*. 2013 Sep;33(3):461-503. DOI: 10.1016/j.cll.2013.03.008. PMID: 23931835
- Cordray MS, Richards-Kortum RR. Emerging nucleic acid-based tests for point-of-care detection of malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 Aug;87(2):223-230. DOI: 10.4269/ajtmh.2012.11-0685
- Roth JM, Korevaar DA, Leeflang MM, Mens PF. Molecular malaria diagnostics: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2016;53(2):87-105. DOI: 10.3109/10408363.2015.1084991
- Mfuh KO, Tassi Yunga S, Esemu LF, Bekindaka ON, Yonga J, Djontu JC, Mbakop CD, Taylor DW, Nerurkar VR, Leke RGF. Detection of *Plasmodium falciparum* DNA in saliva samples stored at room temperature: potential for a non-invasive saliva-based diagnostic test for malaria. *Malar J*. 2017 Oct 27;16(1):434. DOI: 10.1186/s12936-017-2084-5
- Singh R, Singh DP, Gupta R, Savargaonkar D, Singh OP, Nanda N, et al. Comparison of three PCR-based assays for the non-invasive diagnosis of malaria: detection of *Plasmodium* parasites in blood and saliva. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Sep;33(9):1631-9. DOI: 10.1007/s10096-014-2121-z
- Ongagna-Yhombi SY, Corstjens P, Geva E, Abrams WR, Barber CA, Malamud D, Mharakurwa S. Improved assay to detect *Plasmodium falciparum* using an uninterrupted, semi-nested PCR and quantitative lateral flow analysis. *Malar J*. 2013 Feb 22;12:74. DOI: 10.1186/1475-2875-12-74
- Oriero EC, Jacobs J, Van Geertruyden JP, Nwakanma D, D'Alessandro U. Molecular-based isothermal tests for field diagnosis of malaria and their potential contribution to malaria elimination. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Jan;70(1):2-13. DOI: 10.1093/jac/dku343
- Li Y, Kumar N, Gopalakrishnan A, Ginocchio C, Manji R, Bythrow M, Lemieux B, Kong H. Detection and species identification of malaria parasites by isothermal tHDA amplification directly from human blood without sample preparation. *J Mol Diagn*. 2013 Sep;15(5):634-41. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2013.05.005
- Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol*. 2006 Jul;4(7):e204. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040204
- Lalremruata A, Nguyen TT, McCall MBB, Mombo-Ngoma G, Agnandji ST, Adegnika AA, et al. Recombinase Polymerase Amplification and Lateral Flow Assay for Ultrasensitive Detection of Low-Density *Plasmodium falciparum* Infection from Controlled Human Malaria Infection Studies and Naturally Acquired Infections. *J Clin Microbiol*. 2020 Apr 23;58(5):e01879-19. DOI: 10.1128/JCM.01879-19
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000 Jun 15;28(12):E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63
- Tanner NA, Zhang Y, Evans TC Jr. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. *Biotechniques*. 2012 Aug;53(2):81-9. DOI: 10.2144/0000113902
- Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J*

- Biochem Biophys Methods. 2007 Apr 10;70(3):499-501. DOI: 10.1016/j.jbbm.2006.08.008
28. Njiru ZK, Mikosza AS, Armstrong T, Enyaru JC, Ndung'u JM, Thompson AR. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei* rhodesiense. PLoS Negl Trop Dis. 2008 Feb 6;2(1):e147. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000147
29. Poon LL, Wong BW, Ma EH, Chan KH, Chow LM, Abeyewickreme W, et al. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. Clin Chem. 2006 Feb;52(2):303-6. DOI: 10.1373/clinchem.2005.057901
30. Chen JH, Lu F, Lim CS, Kim JY, Ahn HJ, Suh IB, et al. Detection of *Plasmodium vivax* infection in the Republic of Korea by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Acta Trop. 2010 Jan;113(1):61-5. DOI: 10.1016/j.actatropica.2009.09.007
31. Polley SD, Mori Y, Watson J, Perkins MD, González IJ, Notomi T, et al. Mitochondrial DNA targets increase sensitivity of malaria detection using loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbi. 2010;48(8):2866-71. DOI: 10.1128/JCM.00355-10
32. Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H, et al. Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. J Clin Microbi. 2007;45(8):2521-8. DOI: 10.1128/JCM.02117-06
33. Paris DH, Imwong M, Faiz AM, Hasan M, Yunus EB, Silamut K, et al. Loop-mediated isothermal PCR (LAMP) for the diagnosis of falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg. 2007;77(5):972-6.
34. Poschl B, Waneesorn J, Thekisoe O, Chutipongvivate S, Karanis P. Comparative diagnosis of malaria infections by microscopy, nested PCR, and LAMP in northern Thailand. Am J Trop Med Hyg 2010;83(1):56-60. DOI: 10.4269/ajtmh.2010.09-0630
35. Singh R, Savargaonkar D, Bhatt R, Valecha N. Rapid detection of *Plasmodium vivax* in saliva and blood using loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay. J Infect 2013;67(3):245-7. DOI: 10.1016/j.jinf.2013.04.016
36. Ghayour Najafabadi Z, Oormazdi H, Akhlaghi L, Meamar AR, Nateghpour M, Farivar L, Razmjou E. Detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* DNA in human saliva and urine: loop-mediated isothermal amplification for malaria diagnosis. Acta Trop. 2014 Aug;136:44-9. DOI: 10.1016/j.actatropica.2014.03.029
37. Hopkins H, Gonzalez IJ, Polley SD, Angutoko P, Ategeka J, Asiimwe C, et al. Highly sensitive detection of malaria parasitemia in a malaria-endemic setting: Performance of a new loop-mediated isothermal amplification kit in a remote clinic in Uganda. J Infect Dis 2013;208(4):645-52. DOI: 10.1093/infdis/jit184
38. Aydin-Schmidt B, Xu W, González IJ, Polley SD, Bell D, Shakely D, et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) accurately detects malaria DNA from filter paper blood samples of low density parasitaemias. PLoS One. 2014 Aug 8;9(8):e103905. DOI: 10.1371/journal.pone.0103905
39. Njiru ZK. Loop-mediated isothermal amplification technology: towards point of care diagnostics. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(6):e1572. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001572
40. World Health Organization. (2014). WHO policy recommendation on malaria diagnostics in low transmission settings. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/338357>

Информация о соавторе:

Бикетов Сергей Фёдорович, кандидат биологических наук, главный научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-author:

Sergey F. Biketov, PhD (Biological Science), Leading Researcher of Department of Immunobiology of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

НОВОСТИ НАУКИ**Оценка цитотоксичности *in vitro* вещества «ACVR-IN-01» на клеточной модели**

Цель. Оценить цитотоксичность нового химического соединения «ACVR-IN-01» (*in vitro*) на культуре мезенхимальных стромальных клеток (МСК).

Материалы и методы. Использовалась охарактеризованная культура МСК в 4 пассажах из биобанка клеточных культур. Тестируемые образцы «ACVR-IN-01» готовили в концентрациях 25, 200 и 400 мкг/мл. Для каждой исследуемой концентрации «ACVR-IN-01» проводили культивирование в трех повторах. Визуальную оценку состояния клеточной культуры проводили через 24, 48 ч и 7 суток. Оценку функционального состояния МСК осуществляли выявлением общего количества жизнеспособных клеток и иммунофенотипическим исследованием культуры клеток.

Результаты. Культивирование МСК в полной ростовой среде с веществом «ACVR-IN-01» в концентрации 25, 200 и 400 мкг/мл на протяжении 7 суток не влияет на экспрессию антигенов CD90 и CD105 во всех точках наблюдения *in vitro*. Культивирование МСК в полной ростовой среде с веществом «ACVR-IN-01» в концентрации 25, 200 и 400 мкг/мл на протяжении 7 суток не вызвало экспрессии антигенов CD34 и CD45 во всех точках наблюдения *in vitro*.

Заключение. Химическое соединение «ACVR-IN-01» не оказывает существенного влияния на линейную принадлежность МСК. Оценка цитотоксичности исследуемого вещества «ACVR-IN-01» (400 мкг/мл) на культуре клеток в полной ростовой среде показала выраженное снижение экспрессии CD73-антигена на 7-й день экспериментального исследования *in vitro*, сопровождающееся потерей дифференцировочного потенциала МСК в остеогенном и хондрогенном направлении.

Пустовойт В.И., Астрелина Т.А., Балакин Е.И., Кобзева И.В., Степанов А.А.,
Синицына А.А., Изотов А.А., Буткова Т.В., Белорусова А.Е., Самойлов А.С.
Инфекционные болезни. 2022; 20(3): 83–91. DOI: 10.20953/1729-9225-2022-2-3-83-91
Источник: <https://www.phdynasty.ru>

Экспертиза противотуберкулезных лечебных и санаторно-курортных учреждений при репрофилировании

Е.А.Тюрин, И.П.Мицевич, С.А.Благодатских, М.В.Храмов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

В статье рассматривается вопрос организации и проведения мероприятий по репрофилированию организаций и учреждений, работающих в противотуберкулезной области. В связи с переизбытком противотуберкулезных учреждений и необходимостью использования зданий и территории для лечения и профилактики других инфекций специалистам-эпидемиологам и органам здравоохранения в последнее время все чаще приходится сталкиваться с проблемой репрофилирования организаций фтизиатрического профиля. Экспертизу объектов проводят в несколько этапов: работа с документами и их оценка, посещение объекта, отбор проб из зданий и сооружений (соскобы, грунт), проведение бактериологического и генетических анализов, подготовка и утверждение заключительных документов. Показана целесообразность оценки состояния проблемы репрофилирования учреждений и определения основных положений этого процесса перед переводом противотуберкулезных учреждений для нужд общемедицинской практики.

Ключевые слова: туберкулез, лечебные и санаторные объекты противотуберкулезного профиля, репрофилирование, экспертиза

Для цитирования: Тюрин Е.А., Мицевич И.П., Благодатских С.А., Храмов М.В. Экспертиза противотуберкулезных лечебных и санаторно-курортных учреждений при репрофилировании. Бактериология. 2022; 7(4): 85–89. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-85-89

Examination of anti-tuberculosis medical and sanatorium and resort institutions when reprofiling

E.A.Tyurin, I.P.Mitsevich, S.A.Blagodatskikh, M.V.Khramov

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

The article deals with the issue of organizing and carrying out activities for the re-profiling of organizations and institutions working in the anti-tuberculosis field. Despite these threats, epidemiologists have recently increasingly had to face the problem of reprofiling TB organizations. Examination of objects is carried out in several stages: work with documents and their evaluation, site visits, sampling from buildings and structures (scrapes, soil), bacteriological and genetic analyzes, preparation and approval of final documents. The expediency of assessing the state of the problem of re-profiling institutions and determining the main provisions of this process before the transfer of anti-tuberculosis institutions for the needs of general medical practice is shown.

Key words: tuberculosis, medical and sanatorium facilities of anti-tuberculosis profile, re-profiling, examination

For citation: Tyurin E.A., Mitsevich I.P., Blagodatskikh S.A., Khramov M.V. Examination of anti-tuberculosis medical and sanatorium and resort institutions when reprofiling. Bacteriology. 2022; 7(4): 85–89. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-85-89

Для корреспонденции:

Тюрин Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник лаборатории биологической безопасности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 26
Телефон: (4967) 360-016
E-mail: turin@obolensk.org

Статья поступила 09.08.2022 г., принята к печати 28.12.2022 г.

For correspondence:

Eugeny A. Tyurin, MD, PhD, Leading Researcher of The Laboratory of Biological Safety, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 360-016
E-mail: turin@obolensk.org

The article was received 09.08.2022, accepted for publication 28.12.2022

Туберкулез остается серьезной проблемой здравоохранения в мире и является основной причиной смерти среди инфекционных болезней, вызванных единственным возбудителем [1–4]. Современная эпидемическая ситуация по туберкулезу осложняется ростом доли больных с лекарственно-устойчивыми формами туберкулеза [5].

Микобактерии представляют собой прямые или изогнутые палочковидные бактерии, размером $0,2–0,7 \times 1 \times 10$ мкм, однако они могут изменяться до кокковидных форм, округлых сферических или мицелиеподобных структур. Слабо окрашиваются по Граму. Неподвижные, спор и капсул не образуют. Являются мезофилами и аэрофилами, но в процессе жизнедеятельности в неблагоприятных условиях их метаболизм может измениться, и клетки могут трансформироваться в микроаэрофилы или даже становиться анаэробами, не выделяют экзо- и эндотоксинов [6].

Основой каркаса клеточной стенки микобактерий являются два полимера – арабиногалактан и пептидогликан, к которым присоединены миколовые кислоты, воски, липиды, полисахариды и белки. Такой состав клеточной стенки микобактерий обуславливает их высокую устойчивость к воздействию физико-химических факторов: органических и неорганических кислот, щелочей, многих окислителей, спиртов, ацетона, четвертичных аммониевых соединений, рассеянного солнечного света. Микобактерии длительное время могут сохраняться в окружающей среде. Бактерии до нескольких лет могут сохраняться в высушенном состоянии в пыли, в мокроте, на страницах книг, в почве и воде. Низкие температуры также способствуют сохранению жизнеспособности микобактерий.

Для инактивации микобактерий используют нагревание, микроволновое излучение, действующие на микобактерии дезинфицирующие средства или воздействие ультрафиолетового (УФ) излучения, в том числе инсоляцию. Высокая выживаемость микобактерий туберкулеза во внешней среде и длительное сохранение в различных субстанциях (жидкой и сухой мокроте, других выделениях больных, продуктах питания и др.) способствует чрезвычайно широкому распространению этой инфекции среди населения независимо от климатических условий [6].

Для первичного заражения человека микобактериями туберкулеза наиболее характерным является аэрогенный (воздушно-капельный, пылевой) механизм передачи инфекции, гораздо реже заражение происходит алиментарным или вертикальным путем. Распыленный аэрозоль (мельчайшие инфицированные капельки мокроты размером до 5 мкм) сохраняется в воздухе закрытого помещения до 60 мин, а затем оседает на мебель, пол, стены, одежду, белье, пищевые продукты и др. Заражение воздушно-пылевым путем происходит при вдыхании пылевых частиц с включенными в них микобактериями. Алиментарный путь заражения возможен при употреблении в пищу зараженных микобактериями продуктов. Контактный путь заражения через кожу и слизистые оболочки можно наблюдать у лиц, непосредственно работающих с культурой микобактерии туберкулеза или инфекционным материалом [2].

Однако, несмотря на эти угрозы, специалисты эпидемиологи в последнее время все чаще и чаще сталкиваются с вопросом перепрофилирования организаций (лечебницы,

санатории, здравницы и т.п.) противотуберкулезного характера. Перепрофилированные объекты планируется использовать для общемедицинской практики в иных целях [7].

Экспертизу деятельности объектов противотуберкулезного профиля проводит комиссия экспертов в присутствии представителей организации и территориального органа Роспотребнадзора, а при необходимости – представителя органа исполнительной власти субъекта Российской Федерации в сфере охраны здоровья. На основании документов, полученных из организации, эксперты определяют класс опасности (А, Б, В) помещений организации/объекта по степени потенциального риска загрязнения микобактериями туберкулеза и высказывают свои предложения по классу опасности того или иного объекта учреждения. В настоящее время нормативные документы (методические рекомендации) на проведение работ по перепрофилированию отсутствуют [3]. Поэтому нам показалось целесообразным оценить состояние мероприятий по перепрофилированию учреждений и определить основные, на наш взгляд, положения этого процесса.

Цель работы: определить основные мероприятия, проводимые при экспертизе объектов, в которых размещались противотуберкулезные учреждения, и оценить их деятельность при проведении перепрофилирования.

Экспертизу объектов проводят в несколько этапов: посещение объекта, работа с документами и их оценка, отбор проб (соскобы, грунт) из зданий, сооружений и около них, постановка бактериологического и генетических анализов, подготовка и утверждение заключительных документов. Все мероприятия по проведению экспертизы выполняют в рамках договора о ее проведении, в котором оговаривают сроки и итоговые документы, касающиеся проведения экспертизы.

Экспертами являются специалисты, имеющие опыт работы в области эпидемиологии и контроля выполнения требований биологической безопасности при проведении работ с микроорганизмами I–IV групп патогенности (опасности). Кроме того, в группу экспертов входят опытный микробиолог-бактериолог, специалист по микобактериям и специалист по проведению генетических исследований (полимеразная цепная реакция (ПЦР)). Все эти специалисты должны быть допущены к работе с микроорганизмами I–IV групп патогенности (опасности) по своему основному месту работы в соответствии с приказом по организации или учреждению, от которого привлекаются эксперты.

Рассмотрению подлежат документы, подтверждающие уставные положения, право собственности, санитарно-эпидемиологическое заключение и лицензию на проведение работ по профилю. Причем лицензию и санитарно-эпидемиологическое заключение желательно получить не только на всю организацию, но и на отдельные службы (бактериологическую лабораторию, проводившую текущую диагностику анализов, поступивших от пациентов, находящихся на лечении). Кроме того, необходимо запросить и ознакомиться с «Программой проведения производственного контроля» объекта, в которой должны быть указаны контрольные точки и порядок ликвидации различных чрезвычайных ситуаций техногенного и антропогенного характера.

Эксперты знакомятся с инструктивно-методическими документами, действующими в данном учреждении, прежде

всего с инструкцией по соблюдению требований и положений биологической безопасности во время контакта с больными, находящимися на излечении или санаторно-курортном лечении, а при обследовании лаборатории – со специально разработанными операционными процедурами по основной деятельности и другими нормативными материалами.

Проведение дезинфекционных мероприятий и контроль за концентрацией рабочих растворов дезинфицирующих средств – важный аспект проведения экспертизы перепрофилирования. Все мероприятия по текущей и заключительной дезинфекции должны быть оформлены в виде договоров с организациями на проведение дезинфекции, а также актами или протоколами при проведении дезинфекции силами персонала объекта.

Определенное внимание эксперты уделяют вопросу установки, эксплуатации, контроля эффективности УФ-облучателей, как в стационарных корпусах для пребывания больных, так и в бактериологической лаборатории. Они могут быть стационарными потолочными, боковыми, напольными, переносными, на одну, две и более ламп. Эксплуатация УФ-облучателей возможна после введения их в эксплуатацию с составлением акта, который должен быть представлен экспертам. Для каждого типа УФ-ламп, установленных в облучателях, установлен определенный срок эксплуатации в несколько тысяч часов, и контроль за эксплуатацией ламп устанавливается в виде регистрации наработки часов, что и фиксируется в журналах контроля работы УФ-облучателей.

Вопрос обращения с отходами является важным разделом экспертизы учреждения. Отходы могут быть твердыми и жидкими, офисными или биологически опасными, содержащими или подозрительными на содержание биоматериала (от больных, остатки пищи, одноразовая одежда). Экспертам необходимо ознакомиться с инструкциями о порядке обеззараживания отходов и определить схемы сбора, обеззараживания и удаления их для окончательного уничтожения в организации. Также необходимо снять копии с договоров со сторонними организациями о проведении всех мероприятий с отходами. Эксперты рассматривают движение твердых отходов, образующихся на объекте во время пребывания больных, персонала и пр., а также отходов деятельности лаборатории, которые подвергают обеззараживанию различными химическими (замачивание в дезинфицирующих растворах) и физическими (автоклавирование) методами. Эффективность обеззараживания фиксируется в журналах проведения процессов обеззараживания. Обращается внимание на удаление и обеззараживание медицинских отходов (от больных) и из лаборатории: как осуществляется сбор по группам опасности, обеззараживание и уничтожение. Осматриваются площадки для временного хранения отходов по группам, для сбора офисных и иных небактериологических отходов: их оборудование навесами, подъезды транспорта для удаления отходов. Экспертам должны быть представлены договоры на уничтожение обеззараженных твердых отходов на полигоне с отметкой в журнале контроля вывоза отходов.

Необходимо рассмотреть материалы и документы, подтверждающие квалификацию сотрудников (дипломы об об-

разовании, свидетельства, удостоверения, сертификаты), конечно, если они имеются в наличии и могут быть представлены.

Дальнейшее проведение экспертизы касается анализа медицинской деятельности, сведений и данных о количестве коек учреждения отдельно для мужчин и женщин, количества отделений в корпусах, состава медперсонала и его квалификации. Необходимо оценить объем оказываемой медицинской помощи по категориям учета больных, были ли случаи заражения и заболевания во время пребывания в учреждении или повторно. Необходимо уделить внимание анализу состояния медицинского персонала: его количество по категориям (врачи, медицинские сестры, санитарки), как часто и с каким результатом персонал проходил профессиональные медицинские осмотры и лечебно-методические комиссии. Необходимо обратить внимание на заболеваемость медицинского персонала, в том числе туберкулезом, и наличие договора с медучреждением на медицинское обслуживание и госпитализацию в случае подозрения на туберкулез. Эксперты делают выписки из карт профилактических прививок о наличии вакцинации против туберкулеза и иных инфекционных болезней.

Обязательным условием проведения экспертизы является знакомство с актом прохождения сотрудниками ежегодного медицинского осмотра, диспансеризации и с их медицинскими книжками (если они есть).

Далее знакомятся с исторической справкой (если она имеется) об объекте: дата постройки и введения в эксплуатацию зданий, какие объекты размещались на территории и в зданиях с начала их эксплуатации, сроки функционирования учреждения по противотуберкулезному профилю. Оценивают рабочую ситуацию на момент экспертизы: функционирует ли учреждение по профилю, если нет, то запрашиваются дата закрытия и обоснование. На каждый вопрос желательно получить документ, подписанный руководством объекта и заверенный печатью. Основываясь на опыте проведения этих мероприятий, нами был подготовлен примерный перечень документов, которые необходимо запросить у организации или учреждения для проведения экспертизы во время процедуры перепрофилирования.

С каждого документа снимают копии, которые заверяют руководство.

Все работы при посещении объекта или учреждения проводятся в присутствии его полномочных представителей, а также сотрудников санитарной службы, курирующей данный объект. Начинают работы с внешнего осмотра зданий, сооружений, территории, определяют наличие ограждений, подъездных путей, оценивают ухоженность территории.

Экспертиза бактериологической лаборатории противотуберкулезного учреждения – важный раздел работы при проведении экспертной оценки учреждения. Нужно точно установить, как долго лаборатория была задействована в работе, ее расположение, места хранения питательных сред, диагностических препаратов и других расходников, объем и виды выполняемых исследований, имела ли место распорядительная документация, были ли случаи выделения микобактерий.

Необходимо обратить внимание на обустройство помещения для приготовления дезинфицирующих растворов,

обеззараживания и уничтожения биологических отходов. Эксперты оценивают наличие и состояние аварийной, охранной и пожарной сигнализаций. Обращают внимание на количество и состояние использованной рабочей и защитной одежды и средств индивидуальной защиты, их класс безопасности (FFP).

При оценке технического состояния зданий и сооружений учреждения экспертам необходимо получить сведения обо всех зданиях с поэтажной планировкой и экспликацией всех помещений. Если возможно, получить сведения о материалах, из которых изготовлены конструкции здания (фундамент, стены, перекрытия, стропила, крыша, кровля). Нужно оценить вентиляцию (естественную или искусственную), наличие фильтров тонкой очистки воздуха или их отсутствие. Эксперты знакомятся с документами (паспортами) на все имеющиеся приточные и вытяжные системы вентиляции и делают заверенные копии. Запрашивают справки о санитарно-техническом состоянии всех зданий (в том числе проведении капитальных, косметических ремонтов, замены вентиляции, канализации и водопровода, с датами) и проводят осмотр всех построек согласно подготовленным документам.

Для ремонтно-восстановительных работ на объекте должен быть разработан план предупредительного ремонта (ППР), который ежегодно утверждается для проведения восстановительных и ремонтных работ. После окончания ППР должны быть подготовлены протоколы и акты по оценке эффективности инженерных систем объекта.

При проведении экспертизы объекта осматривают территорию, где располагается объект, подъездные пути и внутреннюю разводку дорог, зоны тихого и активного отдыха, а также обращают внимание на благоустройство и озеленение территории.

В корпусах, палатах, подсобных помещениях, коридорах, столовых, кабинетах и других местах нахождения больных и персонала отбирают пробы (смывы, соскобы, срезы пластиковых аксессуаров обустройства палат и коридоров, кусочки штукатурки или гипсокартона, кусочки остатков мягкой рухляди), которые складывают в контейнеры с соответствующей маркировкой для проведения биологического (бактериологического и генетического) анализа на предмет наличия или отсутствия возбудителя туберкулеза. Отбирают пробы почвы из мест активного и тихого отдыха: у беседок, столиков, лавок, у бордюра и ограждения пешеходных дорожек, то есть из всех мест, где возможно пребывание больных и персонала. Пробы маркируют и затаривают в контейнеры для дальнейшего анализа. В дальнейшем пробы поступают в бактериологическую лабораторию, где происходит экстракция предполагаемого возбудителя с последующим разделением экстракта для микробиологического посева и генетического анализа методом ПЦР, при выявлении ДНК микобактерий – с проведением полногеномного секвенирования. Размножаются микобактерии медленно – время генерации составляет 14–22 ч. Рост культуры на плотных питательных средах можно обнаружить не ранее 14–21-х суток, однако первые колонии могут появиться и через 90 суток. На жидких питательных средах культуры вырастают через 4–10 суток, рост некоторых штаммов обнаруживается через 30 суток. Таким образом, положительный результат микробио-

логического исследования может быть получен через 14–48 суток. Положительный ПЦР-тест получают в течении суток. Отрицательный окончательный результат получают при отрицательном тесте ПЦР и отсутствии роста на специальных средах по окончании культивирования 90 суток [8].

По окончании проверочных мероприятий эксперты проводят аналитическую оценку полученных материалов и делают заключение о необходимости дополнительных исследований и, если это необходимо, получения дополнительной информации. Итогом работы экспертов является выдача заключения о возможности репрофилирования объекта.

Работа по репрофилированию учреждений, связанных с противотуберкулезной деятельностью (санаторно-курортные организации, стационары, амбулатории и т.п.), является процедурой длительной и кропотливой. Важным аспектом этой деятельности является квалификация экспертов и специалистов лабораторной практики.

Анализ документов, обследование зданий и сооружений должны проводиться тщательно и вдумчиво, чтобы вопросов в итоге оставалось как можно меньше, а информации было больше. Лабораторные бактериологические и генетические исследования должны проводиться подготовленным и обученным персоналом в специализированных лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности выполнения этих работ в организациях, имеющих лицензию на право проведения работ с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности).

Таким образом, планомерная и последовательная работа, проводимая по репрофилированию медицинских и санаторно-курортных учреждений противотуберкулезной направленности, выполняемая с соблюдением требований биологической безопасности в соответствии с санитарными нормами и правилами, позволит избежать ошибок при проведении этих важных и ответственных работ.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the branch program of Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Перельман МИ, Корякин ВА, Богадельникова ИВ. Фтизиатрия. Учебник. Изд. 3-е перераб. и доп. М.: Медицина; 2004, 520 с.
2. Покровский ВИ, Пак СГ, Брико НИ, Данилкин БК. Инфекционные болезни и эпидемиология. Учебник. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007, 816 с.
3. Санитарные нормы и правила «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» СанПиН 3.3686-21. 2021. 1092 с.
4. Global tuberculosis report 2016: [англ.]: [арх. 14 ноября 2016]. Geneva: WHO, 2016, 201 p.

5. Нечаева ОБ, Бирагова ОК. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в Российской Федерации. Социальные аспекты здоровья населения. 2013. Доступно по: <http://vestnik.mednet.ru/content/view/514/lang,ru/>
6. Покровский ВН, Поздеев ОК. Медицинская микробиология. М.: ГЭОТАР-Медицина; 1999, 1200 с.
7. Храмов МВ, Мицевич ИП, Баннов НН, Тюрин ЕА, Чекан ЛВ. Проведение оценки возможности перепрофилирования противотуберкулезных санаториев в Крыму. Бактериология. 2021;6(3):77.
8. Методические рекомендации по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания (утв. приказом Министерства здравоохранения РФ от 29 декабря 2014 г. №951).
7. Khramov MV, Mitsevich IP, Bannov NN, Tyurin EA, Chekan LV. Provedenie otsenki vozmozhnosti pereprofilirovaniya protivotuberkuleznykh sanatoriev v Krymu. Bacteriology. 2021;6(3):77. (In Russian).
8. Methodological recommendations for improving the diagnosis and treatment of tuberculosis of the respiratory system (approved by Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No 951 of December 29, 2014). (In Russian).

References

1. Perelman MI, Koryakin VA, Bogadelnikova IV. Phthisiology. 3rd ed. Moscow: "Meditsina" Publ.; 2004, 520 p. (In Russian).
2. Pokrovskii VI, Pak SG, Briko NI, Danilkin BK. Infectious diseases and epidemiology. 2nd ed. Moscow: "GEOTAR-Media" Publ.; 2007, 816 p. (In Russian).
3. Sanitary norms and rules "Sanitary and epidemiological requirements for the prevention of infectious diseases" SanPiN 3.3686-21. 2021. 1092 p. (In Russian).
4. Global tuberculosis report 2016: [apx. 14 ноября 2016]. Geneva: WHO, 2016, 201 p.
5. Nechaeva OB, Biragova OK. Tuberculosis epidemic situation in the Russian Federation. Social Aspects of Population Health. 2013. Available at: <http://vestnik.mednet.ru/content/view/514/lang,ru/> (In Russian).
6. Покровский ВН, Поздеев ОК. Медицинская микробиология. М.: ГЭОТАР-Медицина; 1999, 1200 с. (In Russian).

Информация о соавторах:

Мицевич Ирина Петровна, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Благодатских Станислав Александрович, младший научный сотрудник лаборатории биологической безопасности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Храмов Михаил Владимирович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, заместитель директора по качеству и развитию ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Irina P. Mitsevich, Senior Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Stanislav A. Blagodatsky, Junior Researcher of The Laboratory of Biological Safety, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Mikhail V. Khramov, MD, PhD, Deputy Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Новый инструмент для сборки генома

По данным Всемирной организации здравоохранения, *Mycobacterium tuberculosis* заражают около четверти населения мира и убили 1,6 млн человек в 2021 г. Текущие медицинские вмешательства ограничиваются вакциной вековой давности, которая снижает риск заражения на 20%, и приемом сильных антибиотиков от 4 до 6 мес., которые иногда оказываются неэффективными.

Ученые впервые секвенировали геном одного из штаммов туберкулеза – H37Rv – в 1998 г., но до сих пор им так и не удалось создать полную и точную последовательность, которая максимизировала бы их шансы на искоренение болезни.

Новый конвейер, получивший название Vact-Builder, объединяет общие программы сборки генома с открытым исходным кодом в новый и простой в использовании инструмент, который находится в свободном доступе на GitHub.

Сегодня ученые обычно секвенируют новые бактериальные геномы, разрезая большие фрагменты ДНК на маленькие, быстро сканируемые фрагменты, а затем используя эталонную последовательность, такую как H37Rv, для правильного сопоставления всех полученных фрагментов данных. Однако сборка геномов без эталона, как это делает Vact-Builder с данными секвенаторов MinION, позволяет исследователям идентифицировать гены, присутствующие в клинических штаммах, которых может не быть в эталоне.

Последовательность туберкулеза, созданная Vact-Builder, содержит примерно на 6400 тыс. пар оснований больше, чем старый эталон, и идентифицирует новые гены и фрагменты генов, отсутствующие в старом эталоне.

Публикация полностью точного генома эталонного штамма H37Rv, который используется в сотнях исследований в год, должна значительно помочь исследованиям туберкулеза.

New DNA analysis provides accurate tuberculosis genome – ScienceDaily [Электронный ресурс]. URL: <https://www.sciencedaily.com/releases/2022/12/221216131105.htm>

Материалы VII Национального конгресса бактериологов (дополнение)*

г. Санкт-Петербург, 28–30 сентября 2022 г.

Прототип модульной вакцины на основе бактериальных теней *Yersinia pestis*

Анисимов А.П., Вагайская А.С., Жумакаев Р.Х., Дентовская С.В.

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

Одно из направлений реализации федерального проекта «Санитарный щит – безопасность для здоровья» – разработка в короткие сроки (до 4 мес.) вакцин против новых инфекций, в то время как суммарно на разработку одной бактериальной вакцины (базовые исследования, доклинические испытания, 1–3-я фазы клинического этапа) обычно уходит 10–15 лет. В отношении же вирусных инфекций допускается экстренный выпуск вакцин, что не означает полного отказа от их проверки – вакцина проходит установленные протоколом этапы, но в сокращенном варианте. Быстрота разработки противовирусных препаратов объясняется и тем, что размер генома вируса меньше генома бактерии примерно в 2000 раз, что снижает объем и сроки этапа базовых исследований новых вирусных патогенов. Вирусы очень изменчивы и постоянно маскируются от иммунной системы хозяина с помощью аминокислотных замен в одном-двух поверхностных белках. У вируса гриппа А это гемагглютинин и нейраминидаза. Хорошая изученность молекулярной биологии этого вируса позволяет предсказывать вероятные мутации и заранее создавать актуальную вакцину. У бактерий количество переменных (поверхностных антигенов), которые взаимодействуют с иммунной системой, на порядок больше. И, соответственно, предсказание антигенного состава грядущих «пандемических» штаммов маловероятно.

Как же уложиться в срок 4 мес.? Решить эту проблему может технология модульных вакцин, опирающаяся на предварительно созданный конструктор, включающий базовые носители на основе уже известных патогенов и модульные антигены. Наличие заранее приготовленных конструкторов, чьи базовые носители и модульные антигены успешно прош-

ли фазу II клинических испытаний, может ускорить разработку вакцин, но требует предварительных исследований.

В качестве базового носителя выбрали бактериальные тени бесплазмидного штамма *Yersinia pestis* основного подвиды, эффективно защищающие от гибели зараженных чумой морских свинок, а в качестве модульных антигенов – протективные для мышей изоформы белков Caf1 и LcrV. Как и в предварительных исследованиях, иммунная система мышей практически не отвечала на введение бактериальных теней, а у морских свинок, наоборот, формировался напряженный иммунитет. Модульные же антигены Caf1 и LcrV, обеспечивающие 100%-ю защиту мышей, были протективны лишь в отношении ≤70% морских свинок. Двукратное введение прототипа модульной чумной вакцины, включающего как базовый носитель, так и модульные антигены, эффективно защищало оба вида лабораторных животных, причем компоненты, входящие в его состав, взаимно потенцировали протективные свойства друг друга.

Работа выполнена по НИОКР 3.3 в рамках государственного задания.

Рациональная стратегия разработки противобруцеллезных вакцин

Дятлова В.И.

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

Бруцеллез – одно из наиболее распространенных зоонозных заболеваний, передающихся человеку от инфицированных животных, наносящее как экономический, так и социальный ущерб. Необходимость совершенствования специфической профилактики данной инфекции обусловлена напряженной эпидемиологической ситуацией, вызванной наличием на территории России активных очагов бруцеллеза сельскохозяйственных животных, возможностью завоза инфекции из-за рубежа, а также реальной угрозой биотерроризма – причинами, способными вызывать эпидемические проявления чрезвычайного характера.

*Материалы VII Национального конгресса бактериологов опубликованы в журнале «Бактериология» 2022; 7(3): 11-82.

В настоящее время в Российской Федерации применяется живая противобруцеллезная вакцина, разработанная в середине прошлого века, характеризующаяся значительной реактогенностью и недостаточной эффективностью при проведении ревакцинаций. Современные тенденции в разработке вакцин против бруцеллеза, обусловленные стремительным развитием генной инженерии и биоинформатики, включают создание живых генно-модифицированных и векторных вакцин, а также бесклеточных субъединичных и ДНК-вакцин на основе иммунодоминантных антигенов бруцелл. С помощью методов обратной вакцинологии можно уже на начальном этапе создания вакцин выбрать наиболее иммуногенные белки, способные обеспечить долговременный и напряженный противобруцеллезный иммунитет.

Цель настоящего исследования состояла в выявлении антигенов *Brucella abortus*, наиболее перспективных для включения в состав субъединичных вакцин. Для этого с использованием 24 компьютерных программ и нескольких баз данных провели биоинформатический анализ 45 предсказанных поверхностных белков *B. abortus*. В результате анализа выявили 8 белков: WP_002966739.1 (LptD), WP_002964462.1 (BhuA), WP_002965367.1 (Omp25d), WP_002965368.1 (Omp25c), WP_002967184.1 (FigH), WP_002966644.1 (FigE), WP_002969598.1 (AlgEfp) и WP_002963597.1 (MliCfp), наиболее перспективных для включения в состав вакцинного препарата. Адьювантная активность показана для рекомбинантных белков Omp16, Omp19, BLS, BCSP31 и липополисахарида *B. abortus*. Также во многих исследованиях продемонстрирована адьювантная способность флагеллинов, стимулирующих врожденный иммунитет через активацию TLR5.

Таким образом, включение в состав мультиантигенных вакцин ранее изученных белков, в том числе обладающих адьювантными свойствами, а также «новых», выявленных с помощью методов биоинформатики, антигенов может стать ключом к созданию эффективной вакцины против бруцеллеза. Несмотря на логичность и обоснованность подхода обратной вакцинологии, только экспериментальные данные можно рассматривать как надежный источник информации об эффективности вакцинного препарата.

Работа выполнена по НИОКР 3.1.2 в рамках государственного задания.

Оценка разнообразия штаммов ботулинических клостридий, выделенных в 2018–2022 годах

Зенинская Н.А., Мицевич И.П., Комбарова Т.И., Карцев Н.Н., Детушев К.В., Фирстова В.В., Храмов М.В.

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

Ввиду повсеместного распространения патогенных клостридий постоянный санитарный контроль и своевременное определение вызываемых ими токсикоинфекций являются важной задачей для клиницистов и эпидемиологов. Несмотря на сравнительную редкость подобного рода заболеваний, тяжесть протекания пищевого ботулизма и последующих

осложнений мотивирует к всестороннему анализу рисков и разработке более современных средств терапии.

Целью данной работы является идентификация и оценка токсикологических свойств ботулинических клостридий, полученных из проб клинического материала и пищевых продуктов в период с 2018 по 2022 г.

Материалы и методы. Выделение культур из образцов осуществлялось на дифференциальных питательных средах, культивирование в анаэробных условиях проводилось с использованием анаэроостатов. Видовая идентификация морфологически сходных штаммов производилась методом времяпролетной масспектрометрии с матрично ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS). Генотипирование осуществлялось методом 16S rRNA секвенирования. Все полученные штаммы депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ Оболенск».

Токсикологический анализ выделенных штаммов был проведен методом биопробы на мышах. При наличии гибели животных производили титровку культуральной жидкости для повторной проверки на мышах с целью определения приблизительных концентраций наработанного токсина.

Результаты. В ходе данных исследований удалось выделить 25 штаммов рода *Clostridium*, 48% из которых оказались представителями вида *C. botulinum*. Среди выявленных ботулинических клостридий 33,3% синтезировали ботулотоксин типа А, 16,6% – типа В и 25% – типа Е. Помимо этого, 25% штаммов были способны вырабатывать нейротоксины двух типов.

Токсическая активность штаммов варьировала в широких пределах: от инициации болезненных состояний у лабораторных животных и отсутствия летальности до выработки значительных количеств токсина (ориентировочно 200 000 мышинных внутриперитонеальных доз LD₅₀ в 1 мл суточного культурального бульона). При этом наиболее интенсивными продуцентами оказались штаммы, синтезирующие 2 типа токсина.

Выводы. В результате данной работы нам удалось выявить широкое разнообразие штаммов *C. botulinum*, представляющих серьезные риски для населения.

Работа выполнена по НИОКР 3.1. в рамках государственного задания.

Реконструкция полных последовательностей бактериальных хромосом и плазмид штаммов *Yersinia pestis*

Кисличкина А.А., Сизова А.А., Скрябин Ю.П., Платонов М.Е., Соломенцев В.И., Богун А.Г., Дентовская С.В., Анисимов А.П.

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

Yersinia pestis – возбудитель природно-очаговой особо опасной инфекционной болезни, сопровождающейся высокой летальностью и вероятностью эпидемического распро-

странения. Природные очаги чумы существуют на всех континентах, кроме Австралии и Антарктиды. На территории СНГ расположено 43 очага чумы. Основными носителями в природных очагах чумы являются дикие грызуны – сурки, суслики, песчанки, полевки и многие другие, а передачу чумы обеспечивают как минимум 80 видов блох. Широкий круг хозяев и переносчиков в сочетании с географической разобщенностью отдельных природных очагов чумы с различными экологическими условиями способствуют селекции генетических вариантов, специфичных для определенных природных очагов. Анализ геномов штаммов *Y. pestis* способствует накоплению знаний о происхождении, филогении и генетическом разнообразии возбудителя чумы. Реконструкция полного генома, в котором установлены порядок и ориентация всех участков нуклеотидной последовательности, позволяет сравнивать структуру всего генома, выявлять инверсии и определять точное количество повторяющихся элементов.

Целью работы являлась реконструкция полных последовательностей бактериальных хромосом и плазмид штаммов *Y. pestis*, относящихся к геногруппе 2.MED1, но выделенных в разных очагах, и оценка их различий.

В исследование были включены 2 штамма *Y. pestis* – штамм C-690 (выделен в очаге 43) и штамм C-332 (очаг 01). Для реконструкции полных геномов штаммов *Y. pestis* ДНК секвенировали на платформах Illumina MiSeq и Nanopore MinION. Гибридную сборку полной последовательности геномов проводили с помощью программы Unicycler v0.4.7 с настройками по умолчанию. Финальные сборки геномов штаммов содержали по четыре кольцевых контига. С помощью сервиса BLAST (nucleotide search) идентифицированы хромосомы и плазмиды. Геном штамма *Y. pestis* C-690 состоит из хромосомы (4 619 998 п.н.) и плазмид: pMT (100 989 п.н.), pCD (70 509 п.н.) и pPCP (9 610 п.н.). Геном штамма *Y. pestis* C-332 состоит из хромосомы (4 503 017 п.н.) и плазмид: pMT (100 989 п.н.), pCD (70 509 п.н.) и pPCP (9 610 п.н.). Для детального сравнения хромосом использовали программу Snippy. В результате было выявлено 39 SNP, 3 комплексных SNP, 24 делеции и 24 инсерции. При сравнении хромосом в программе Mauve выявлены три участка инверсий, а также в хромосоме штамма *Y. pestis* C-332 отсутствует *rgm*-локус. Плазмиды имеют одинаковый размер, pPCP идентичны, а pMT и pCD штамма *Y. pestis* C-690 отличаются от гомологичных плазмид штамма *Y. pestis* C-332 на одну SNP.

В результате проведенной работы получены полные последовательности бактериальных хромосом и плазмид штаммов *Y. pestis*. Анализ геномов позволил выявить различия между штаммами, относящихся к геногруппе 2.MED1, но выделенных в разных природных очагах.

Работа выполнена по НИОКР 1.1.18 в рамках государственного задания.

Оценка эффективности изотермических амплификационных технологий для выявления возбудителей мелиоидоза и сапа

Леденева М.Л.¹, Буй Т.Л.А.², Ткаченко Г.А.¹,
Бартенева М.В.¹, Захарова И.Б.¹

¹ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград, Российская Федерация;

²Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр, Ханой, Вьетнам

Методы изотермической амплификации ДНК/РНК активно рассматриваются в молекулярной диагностике инфекционных заболеваний как альтернатива полимеразной цепной реакции (ПЦР), в связи с чем оценены критерии диагностической ценности методов выявления возбудителя мелиоидоза, основанных на изотермических технологиях – петлевой изотермической амплификации (LAMP) и реакции транскрипционной амплификации в режиме реального времени (RT-NASBA).

Оценка аналитических характеристик LAMP показала 100%-ю специфичность при аналитической чувствительности 68,8 фг в реакционной смеси, что соответствует 1×10^3 м.к./мл. Для оценки эффективности LAMP для выявления *Burkholderia pseudomallei* в сравнении с ПЦР при тестировании одной и той же генной мишени (*orf2* кластера T3SS1) исследовали тотальную ДНК, выделенную непосредственно из проб почвы, отобранных во Вьетнаме. Образцы для тестирования были выбраны на основании результатов бактериологического исследования и ПЦР на зарегистрированном наборе реагентов (PY P3N 2018/7785) с секвенированием полученных фрагментов. Исследованы 21 положительная и 4 отрицательных пробы. Предсказательная ценность положительного результата LAMP и ПЦР составили 86 и 100%, отрицательного результата – 25 и 57%; диагностическая эффективность – 76 и 88%. Невысокие диагностические показатели LAMP, по видимому, обусловлены высоким GC-составом видоспецифической для *B. pseudomallei* мишени.

Аналитическая чувствительность экспериментальной тест-системы «АмплигенBurk23S pPHK-PB» для выявления возбудителей мелиоидоза и сапа в RTNASBA составила 2 фг в реакционной смеси, что соответствует 0,4 фг/мкл тотальной РНК в образце (1×10^1 м.к./мл), при 100%-й специфичности. Диагностические показатели оценивали на пробах биоматериала от сирийских хомячков с острым экспериментальным мелиоидозом и сапом (по 20 проб от 4 инфицированных и по 5 проб от контрольных животных на каждую инфекцию). Для сравнения использовали группоспецифическую ПРЦ в реальном времени (ПЦР-РВ) (PY P3N 2013/1227). Необходимо отметить, что в ПЦР-РВ все 4 пробы крови от сапных животных были отрицательными, при этом в RT-NASBA была 1 положительная. При экспериментальном мелиоидозе в ПЦР-РВ была одна положительная проба крови, а в RT-NASBA – 4. Это свидетельствует, что уровень бактериальной нагрузки в крови при мелиоидозе или сапе часто

не достигает предела чувствительности метода ПЦР-РВ, что согласуется с данными других исследователей. Предсказательные ценности положительного результата у RT-NASBA и ПЦР-РВ составили по 100% для обеих инфекций, отрицательного результата – 83 и 56% для мелиоидоза, 50 и 38% для сапа; диагностическая эффективность – 96 и 84% для мелиоидоза, 80 и 68% для сапа.

Таким образом, применение LAMP для выявления возбудителя мелиоидоза по чувствительности сопоставимо с ПЦР-РВ, но значительно уступает последнему по диагностической эффективности, в то время как RT-NASBA превосходит ПЦР-РВ как по аналитическим, так и по диагностическим характеристикам и может быть рекомендована для исследования проб с заведомо невысокой бактериальной нагрузкой, а также для верификации дискордантных результатов других методов исследования.

Корреляционный анализ резистентности к антибиотикам и дезинфицирующим средствам у штаммов патогенных буркхольдерий, устойчивых к бензалкония хлориду

Лучинин Д.Н., Молчанова Е.В.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград, Российская Федерация

Burkholderia pseudomallei и *Burkholderia mallei* – микроорганизмы, относящиеся ко II группе патогенности и способные вызывать у человека тяжелые инфекционные заболевания (melioidosis и sap соответственно). Известно, что данные микроорганизмы могут проявлять множественную лекарственную устойчивость. Для отдельных филогенетически близкородственных *B. pseudomallei* и *B. mallei* видов показано наличие резистентности к различным дезинфицирующим агентам и определена положительная корреляционная зависимость между наличием устойчивости к дезинфектантам и антибиотикам.

Цель работы заключалась в изучении причинно-следственной связи между устойчивостью к дезинфектантам и антибиотикорезистентностью штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, выращиваемых на питательной среде с добавлением бензалкония хлорида.

Штаммы патогенных буркхольдерий культивировали на питательных средах с добавлением бензалкония хлорида в повышающихся концентрациях. У исходных штаммов и полученных вариантов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, устойчивых к бензалконию хлорида, определяли устойчивость к амоксициллину, цефтазидиму, доксициклину, меропенему и триметоприму диско-диффузионным методом. Корреляционный анализ между резистентностью к антибиотикам и дезинфицирующим средствам проводили с применением коэффициента корреляции Пирсона.

В результате работы были получены штаммы, характеризующиеся повышенной резистентностью к бензалкония хлориду. Данный признак сохранялся при их культивирова-

нии в течение 15 нед. в отсутствие ингибирующего агента. Анализ чувствительности к антибактериальным препаратам у штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, устойчивых к дезсредству, выявил наличие высокой корреляционной связи между снижением чувствительности к бензалкония хлориду и повышением резистентности к амоксиклаву и цефтазидиму. Статистическая обработка данных показала значимую корреляцию между этими признаками. Так, была выявлена прямая корреляционная зависимость высокой силы для амоксициллина ($r = 0,7$) и цефтазидима ($r = 0,8$). При этом какие-либо причинно-следственные связи между повышением устойчивости к дезинфектанту и резистентностью к доксициклину ($r = 0,0$), меропенему ($r = 0,1$) и триметоприму ($r = -0,1$) отсутствовали.

Таким образом, штаммы патогенных буркхольдерий при формировании устойчивости к бензалкония хлориду приобретают резистентность к амоксициллину и цефтазидиму.

Особенности выделения вируса Западного Нила из проб клинического материала и объектов окружающей среды для сохранения исходных патогенных свойств изолята

Мачнева А.Ю., Герасимова А.Д., Гусев Е.А., Лучинин Д.Н., Молчанова Е.В.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград, Российская Федерация

Вирус Западного Нила (ВЗН) относится к роду *Flavivirus*, антигенному комплексу японского энцефалита семейства *Flaviviridae* и является возбудителем лихорадки Западного Нила (ЛЗН). Для изоляции вируса из клинического материала, а также из объектов окружающей среды и дальнейшего его изучения необходимо подобрать модель, которая способна не только обеспечить эффективную репродукцию вируса, но и сохранить исходные свойства изолята.

Для выделения ВЗН могут быть использованы новорожденные мыши, клеточные линии млекопитающих Vero, ВНК-21 и насекомых С6/36, куриные эмбрионы. Особенности строения и биохимические свойства биологических моделей способствуют отбору варианта, максимально адаптированного к инфицированию клеток и репликации в конкретных условиях.

С целью уточнения характера влияния биологической модели, используемой для выделения ВЗН, на патогенные свойства получаемого изолята в течение 2018–2021 гг. пробы, в которых была обнаружена РНК ВЗН, пассировали одновременно на различных моделях: мышах-сосунках, клеточных линиях Vero и С6/36, перепелиных эмбрионах.

Патогенные свойства полученных вариантов изолятов ВЗН изучали с помощью заражения аутобредных белых мышей (модель млекопитающих) и чижей (модель птиц, чувствительных к инфекции ВЗН).

В результате было установлено, что с использованием мышей-сосунков селекционировались наиболее вирулент-

ные варианты ($LD_{50} 3,8 \times 10^3 \pm 0,005 \times 10^4$ БОЕ, $p \leq 0,05$), при заражении которыми быстро (на 3–4-е сутки) развивалась нейротропная форма ЛЗН (в 67%). Схожими свойствами, за исключением нейротропности, характеризовались изоляты, полученные с помощью клеточной линии Vero (гриппоподобная форма заболевания у мышей и птиц в 42% случаях на 4-е сутки). Изоляты ВЗН, выделенные с использованием перепелиных эмбрионов, проявляли выраженные патогенные свойства в отношении чужих, вызывая токсико-септическую форму заболевания и 100%-ю летальность на 5-й день ($LD_{50} 5 \times 10^2 \pm 0,005 \times 10^3$ БОЕ, $p \leq 0,05$). У мышей в те же сроки развивалась гриппоподобная форма ЛЗН в 44% случаев. В случае применения в качестве модели для изоляции ВЗН клеточной линии С6/36 образовывались варианты, обладающие наименьшей вирулентностью ($LD_{50} 7,6 \times 10^5 \pm 0,005 \times 10^4$ БОЕ, $p \leq 0,05$), вызывающие гриппоподобную форму заболевания в 34% случаев и в более поздние сроки (на 7–9-е сутки).

Таким образом, выбор модели для восстановления ВЗН с сохранением исходных патогенных свойств зависит от вида нативного материала (кровь людей, кровососущие комары, головной мозг птиц и т.д.). Так, для выделения ВЗН из проб от людей с нейроинвазивной формой ЛЗН необходимо использовать мышей-сосунков, из проб от больных людей без неврологических проявлений, а также из образцов органов мелких млекопитающих – культуру клеток Vero, из проб пулов кровососущих членистоногих – культуру клеток С6/36, из образцов органов птиц – перепелиные эмбрионы.

Получение моноклональных антител к вирусу Западного Нила и их иммунохимическая характеристика

Пименова Е.В., Елхова А.В.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград, Российская Федерация

Вирус Западного Нила (ВЗН) является представителем рода *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* и принадлежит к антигенному комплексу вируса японского энцефалита. Долгое время считалось, что ВЗН не способен вызывать значимые вспышки заболевания у человека и распространен только в Африке. На сегодняшний день ареал ВЗН охватывает территории Африки, Европы, Азии. В Российской Федерации случаи заболевания лихорадкой Западного Нила (ЛЗН) документально подтверждены на территории более 20 субъектов федерации, а циркуляция возбудителя по результатам мониторинговых исследований объектов внешней среды и серологического обследования здорового населения – более чем в 70 субъектах федерации.

Основными методами выявления маркеров возбудителя являются иммунологические и молекулярно-генетические. С помощью иммунологических методов в полевом и клиническом материале обнаруживаются как антигены, так и антитела. Однако к экспресс-методам анализа относят метод флуоресцирующих антител и реакцию непрямой гемагглютинации. В связи с этим возникает потребность в разработке

и совершенствовании высокоэффективных диагностических средств на основе моноклональных антител (МКА) с целью контроля распространения патогена на новые территории, а также в связи с необходимостью обеспечения импортозамещения на российском рынке.

Цель работы: получить МКА к ВЗН и охарактеризовать их иммунохимическими методами.

Для получения гибридом-продуцентов МКА линейных мышей Balb/c циклично иммунизировали цельновирионным антигеном ВЗН CH1EN-1 с последующей гибридизацией В-лимфоцитов с клетками мышиной миеломы Sp2/0. В результате слияния были отобраны три клона (С8, С2, Н7), стабильно продуцирующих антитела. Свойства МКА к ВЗН, полученных из асцитической жидкости инбредных мышей и выделенных осаждением сульфатом аммония, оценивали в реакции иммунопреципитации и с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Изотипирование МКА проводили в соответствии с инструкцией по применению к набору реагентов Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (Sigma-Aldrich, США). В качестве положительного контрольного образца использовали инактивированный антиген ВЗН из набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу Западного Нила в сыворотке (плазме) крови «ВектоНил-IgM» (АО «Вектор-Бест»).

Результаты изотипирования, полученные на двух типах антигенов, показали, что все три МКА принадлежали к классу М. Было установлено, что клеточные линии С8 и С2 продуцировали антитела, которые специфически взаимодействовали с антигенами ВЗН как в реакции преципитации, так и в ИФА. Специфическую активность субклонов линий С8 и С2, выявленную с помощью цельновирионного антигена ВЗН CH1EN-1, адсорбированного на твердой фазе, регистрировали в разведении исследуемых образцов 1:104 и 1:103 соответственно. При использовании инактивированного антигена ВЗН титры антител были незначительно ниже и составили 1:103 и 1:102. В то же время МКА линии Н7 не проявляли специфической активности в отношении положительного контрольного образца ни в реакции преципитации, ни в ИФА.

Таким образом, полученные МКА к ВЗН гибридом-продуцентов линий С8 и С2 могут быть использованы для изготовления на их основе иммунодиагностических препаратов.

Обеспечение успешной идентификации белковых токсинов с использованием методов масс-спектрометрического анализа

Сурин А.К., Евтюхова А.Е., Петухов Н.А., Фирстова В.В.

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

В настоящее время основным методом точного определения вида белковых мишеней в любых биологических матрицах является метод, основанный на применении тандема высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и

масс-спектрометрии высокого разрешения (МС). Этот метод основан на предварительном разделении пептидов, полученных после обработки белка / смеси белков ферментом (протеазой) с помощью ВЭЖХ и дальнейшем анализе смываемых с разделяющей колонки пептидов на масс-спектрометре. Такая методика дает возможность с высокой достоверностью определять, какой белковой последовательности соответствует тот или иной пептид.

Современные масс-спектрометрические приборы позволяют работать с пептидами длиной от 6 до 40 аминокислот. Таким образом, качество идентификации белков методом ВЭЖХ-МС зависит от подбора протеазы (фермента, гидролизующего пептидную связь белка). Целью такого подбора является использование такой протеазы, которая будет разрезать целевой белок на пептиды оптимальной длины для анализа на ВЭЖХ-МС. Наибольшую распространенность для этих целей получила протеаза трипсин. Это высокоспецифичная протеаза, которая разрезает белок по пептидной связи между аминокислотами K-X или R-X, где K – лизин, R – аргинин X – любая аминокислота, кроме пролина. Использование трипсина для обработки белков при подготовке к масс-спектрометрическому анализу позволяет качественно идентифицировать как отдельные белки, так и целые протеомы клеток или животных тканей. Однако недостаток использования такого подхода может проявиться в случае работы с малым количеством целевого белка, находящимся в сложной биологической матрице, содержащей большое количество белков кроме искомого целевого белка, причем часто концентрация этих белков на порядки может превышать концентрацию целевого белка.

Первая проблема связана с взаимным расположением лизинов и аргининов в полипептидной цепи. В случае большого процента количества этих аминокислот относительно вклада всех остальных целевой белок может разрезаться преимущественно на малые пептиды, с небольшим количеством средних пептидов, оптимальных для масс-спектрометрического анализа. Или противоположный случай – небольшое содержание лизинов и аргининов, что приведет к получению слишком больших пептидов, сложных для анализа. Таким образом, для контроля конкретного целевого белка необходимо заранее проанализировать его аминокислотную последовательность для принятия решения по использованию оптимальной протеазы для подготовки проб данного белка.

Другая проблема заключается в том, что расчет количества протеазы, необходимой для пробоподготовки, произво-

дится из среднего соотношения белок/протеаза 100:1 или 50:1. При работе с большим белковым фоном относительно целевого белка придется использовать большое количество протеазы, что ведет к большому расходу протеазы и повышению цены анализа. Кроме того, в такой сложной матрице качество гидролиза белка также будет ухудшаться. Большое количество потенциальных мест разрыва пептидных связей будет пропускаться, причем у разных молекул одного и того же белка они будут разные, что приведет к снижению концентраций одинаковых пептидов и увеличению их разнообразия по длине. В ряде случаев эту проблему может решить использование альтернативного метода гидролиза белка без использования ферментов. Такой альтернативой является метод, основанный на использовании цианогенбромида, низкомолекулярного химического вещества. Данный метод эффективен для белков с высоким содержанием метионинов, так как использование этого агента позволяет гидролизовать пептидную связь между метионином и любой другой аминокислотой (кроме пролина). При этом метионин переходит в гомосерин или гомосерин лактон. В зависимости от концентрации белков можно использовать более высокую концентрацию этого агента. Даже при очень высокой концентрации цианогенбромида можно очистить от него полученный препарат пептидов при хроматографии, и он не будет мешать при масс-спектрометрическом анализе.

Для работы с белком ботулотоксина нами была предварительно проанализирована аминокислотная последовательность этого белка. Были рассчитаны теоретически возможные фрагменты этого белка при использовании трипсина. Показано, что в этом случае будут образовываться преимущественно пептиды либо с малой, либо с очень большой длиной. Экспериментально было показано, что использование трипсина дает низкое покрытие экспериментально идентифицированными пептидами аминокислотной последовательности самого ботулотоксина. С другой стороны, в данном белке большое содержание метионинов, а их взаимное расположение дает надежду на получение большого количества пептидов с длиной от 10 до 40 аминокислотных остатков. Мы провели ряд предварительных экспериментов по подбору условий гидролиза ботулотоксина цианогенбромидом. Предварительные эксперименты показали эффективность использования данного агента для гидролиза белка ботулотоксина с целью повышения эффективности его обнаружения.

Работа выполнена по НИОКР 1.1.14 в рамках государственного задания.

Правила оформления статей

(основные положения)

Журнал «Бактериология» публикуется на русском языке (резюме статей и ключевые слова – на русском и английском языках), распространяется на бумажном носителе и публикуется в электронной форме.

К публикации принимаются экспериментальные и обзорные статьи, а также короткие сообщения по прикладным и фундаментальным вопросам медицинской, ветеринарной и сельскохозяйственной бактериологии. Статьи принимаются без ограничения объема от граждан любой страны на русском языке. По согласованию с редакцией допускается публикация рекламных материалов, соответствующих тематике журнала.

Публикации, созданные в порядке выполнения служебного задания, должны иметь направление от учреждения, в котором выполнена работа. В направлении следует указать, что представленный материал ранее не был нигде опубликован и не находится на рассмотрении для публикации в других изданиях (включая зарубежные).

К публикации прилагается экспертное заключение организации об отсутствии ограничений для открытой публикации представленных материалов.

Материалы для публикации, включая сопровождающие документы, направляются в редакцию в электронной форме по адресу: info@obolensk.org или bacteriology@obolensk.org. В теме сообщения следует указать «Бактериология».

Требования к оформлению статьи.

Экспериментальная статья должна состоять из разделов: введение, материалы и методы, результаты и обсуждение, список литературы.

Рукопись должна быть подготовлена в текстовом редакторе MS Word, шрифт – Times New Roman, размер – 14, межстрочный интервал – 1,5, поля – 2 см. Статья должна включать резюме и ключевые слова на русском и английском языках. Нумерация всех страниц рукописи сквозная.

Краткие сообщения представляются без таблиц и рисунков.

Статья должна быть подписана всеми авторами, включая иностранных.

К статье следует приложить сведения об авторах на русском и английском языках с указанием адреса, контактных телефонов (служебного и мобильного), факса и электронной почты с указанием автора, ответственного за переписку с редакцией.

Заглавие статьи оформляется следующим образом:

НАЗВАНИЕ СТАТЬИ

И. И. Иванов*, П. П. Петров**

*Первая организация, г. Москва, РФ

**Вторая организация, Техас, США

E-mail

[далее текст аннотации и ключевые слова]

Текст статьи, включая резюме, список литературы, подписи к рисункам и таблицы, должны быть оформлены одним файлом, а каждый рисунок – отдельным файлом.

РЕЗЮМЕ статьи должно быть представлено на русском и английском языках, отражать основные полученные результаты и содержать не более 250 слов.

КЛЮЧЕВЫХ СЛОВ (словосочетаний) должно быть не более 10, на русском и английском языках.

Во ВВЕДЕНИИ (без заголовка) следует изложить мотивацию написания данной работы и отдельным абзацем обозначить цель исследования. Дополнительно на английском языке.

Раздел МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ должен содержать сведения об объекте исследования (включая источник получения, название коллекции) и краткое описание использованных методик, позволяющее их воспроизвести (на ранее опубликованные и общеизвестные методы дается ссылка); для приборов и реактивов указываются название фирмы на языке оригинала в кавычках и страны в скобках.

Следует использовать общепринятые современные сокращения мер, физических, химических и математических величин, терминов и т.д. Единицы измерения должны даваться в единицах СИ (Система Интернациональная). Обозначения мутантных и рекомбинантных форм микроорганизмов следует приводить в соответствии с международными правилами. Для трехбуквенного обозначения генов бактерий используют строчные буквы (курсив).

Рисунки и таблицы размещаются в тексте статьи в соответствии с пожеланиями авторов. Кроме того, черно-белые и цветные рисунки (в формате *.jpg) прилагаются к статье в виде отдельных файлов (ris1.jpg, ris2.jpg и т.д.)

Сведения о финансовой поддержке работы приводятся в конце текста статьи перед списком литературы.

В СПИСКЕ ЛИТЕРАТУРЫ указываются авторы, название статьи, название журнала или сборника, год, номер, страницы. Для названия журналов используются общепринятые сокращения (<http://www.nlm.nih.gov/>).

В случае невыполнения настоящих правил оформления статья не принимается и отсылается авторам на доработку.

Редакция оставляет за собой право редактировать статьи по согласованию с автором.

Присланные в редакцию статьи проходят процедуру рецензирования. В случае отклонения статьи редакция направляет автору мотивированный отказ.

Публикация – бесплатная.

Статьи направлять по адресу:
142279, Московская обл.,
г.о. Серпухов, п. Оболенск,
Территория "Квартал А", д. 24, ГНЦ ПМБ
Тел. (4967) 36-00-46
Факс (4967) 36-00-10
E-mail: info@obolensk.org
или
bacteriology@obolensk.org