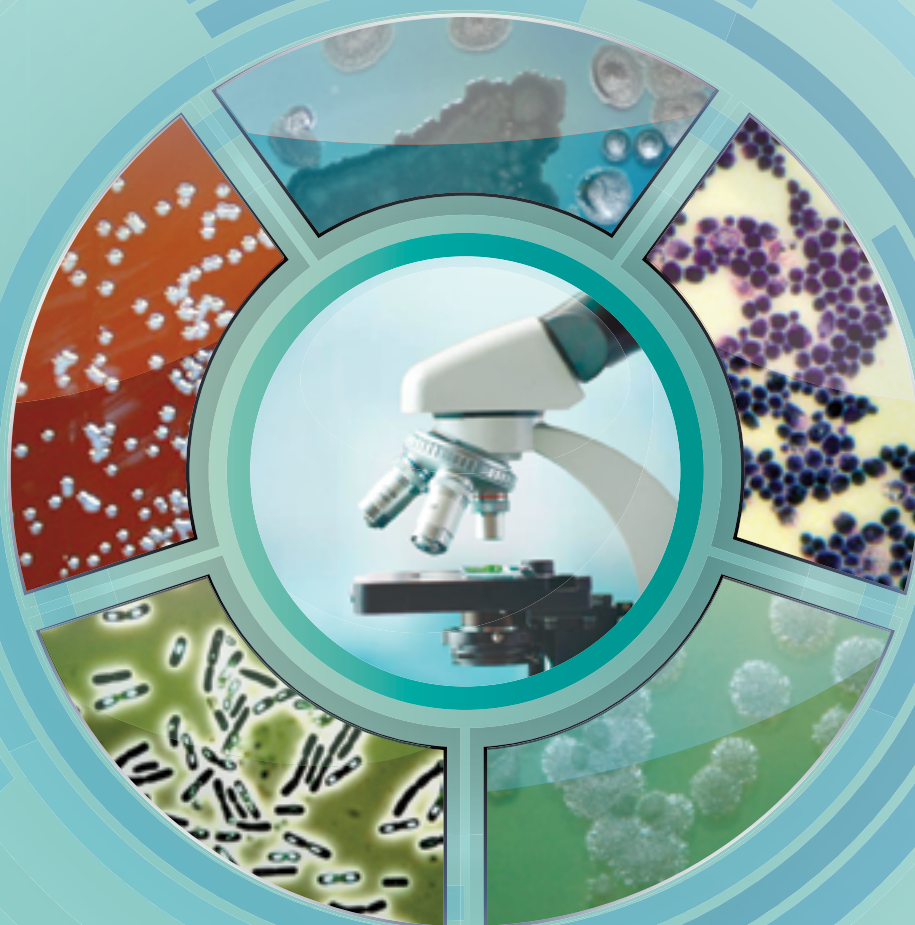


БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2023 • ТОМ 8 • №1

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

Учредитель

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

Журнал входит в Перечень ведущих научных журналов и изданий ВАК,
в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук, РИНЦ

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 28.04.2023 г.

Отпечатано: Мастерская печати Old School,
603105, Нижний Новгород, ул. Чаичиной, 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

- О включении журнала «Бактериология» в перечень ВАК Минобрнауки России 5

Экспериментальные статьи

- Мышиные модели пневмококкового сепсиса, вызываемого вирулентным и авирулентным штаммами *Streptococcus pneumoniae*
А.И.Борзилов, О.В.Коробова, Т.И.Комбарова, Е.С.Перескокова, Е.А.Ганина 7
- Разработка и оценка качества полужидкой модифицированной среды Раппапорта–Василиадиса (среда MSR/V)
А.Ю.Иванова, О.В.Полосенко, М.В.Храмов 17
- Вариант сибиреязвенного вакцинного штамма СТИ-1 с гемолитической и лецитиназной активностями
Л.И.Маринин, Н.А.Шишкова, Е.А.Тюрин, А.Н.Мокриевич, И.А.Дятлов 23
- Методология детекции ботулотоксина типа А на масс-спектрометре типа тройного квадрупольа
А.К.Сурин, А.Е.Евтюхова, М.М.Рогозин, И.Г.Шемякин, В.В.Фирстова 30
- Изучение ростовых свойств питательных сред и валидация методов по выделению бактерий родов *Proteus* и *Providencia* из кормов для животных
А.А.Кремлева, О.В.Полосенко 37
- Использование диоксида кремния для очистки рекомбинантных белков
Е.М.Мазурина, П.Х.Копылов, С.В.Дентовская 43
- О прогнозировании сроков годности сыворотки листериозной агглютинирующей сухой
Н.М.Андреевская, Н.М.Хаптанова, Ж.А.Коновалова, Н.Г.Гефан,
И.Б.Вершинская, И.И.Баертуева, С.В.Балахонов 51
- Иммунный статус детей с коли-инфекцией, вызванной гемолитической кишечной палочкой
М.И.Юсупов 56

Обзорная статья

- Хроническое брюшнотифозное бактерионосительство: проблемы и пути решения
И.Х.Маматкулов, П.Е.Игнатов, А.И.Маматкулов, Л.В.Кудашева 59

Проблемная статья

- Организация работы диагностической ковидной лаборатории на базе потенциально опасного биологического объекта
С.А.Благодатских, Е.А.Тюрин, А.Е.Курилова, М.В.Храмов 62

- Правила оформления статей (основные положения) 66

BACTERIOLOGY

Scientific and Practical Journal

Editor-in-Chief

I.A.Dyatlov, academician of RAS, Sc.D., prof.
(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.Adyasayren, Sc.D., prof. (Mongolia)
I.A.Bazikov, Sc.D., prof. (Russia)
M.Y.Boiro, ScD., prof. (Republic of Guinea)
L.N.Chernousova, Sc.D., prof. (Russia)
S.V.Dentovskaya, Sc.D. (Russia)
L.V.Domotenko, PhD (Russia)
V.A.Gorbunov, PhD (Belarus)
Sh.Gurbanov, PhD (Republic of Azerbaijan)
G.A.Karimova, PhD (France)
A.V.Karlyshev, PhD, prof. (Great Britain)
L.V.Kolombet, Sc.D. (Russia)

M.N.Kosoi, PhD (USA)
I.Kh.Mamatkulov, Sc.D., prof. (Uzbekistan)
S.G.Mardanly, Sc.D. (Russia)
T.V.Meka-Mechenko, Sc.D. (Kazakhstan)
V.L.Motin, PhD, prof. (USA)
T.V.Priputnevich, corr.member of RAS, ScD (Russia)
A.V.Rakin, PhD (Germany)
K.Yu.Shatalin, PhD (USA)
I.G.Shemyakin, Sc.D., prof. (Russia)
E.A.Svetoch, Sc.D., prof. (Russia)
V.N.Tsarev, Sc.D., prof. (Russia)

Founder and Publisher

© State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Abstracting journal is indexed in the Russian Science Citation Index

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

On the inclusion of the journal "Bacteriology" in the list of the Higher Attestation Commission of the Ministry of Education and Science of Russia	5
--	---

Experimental Articles

Mouse models of pneumococcus sepsis caused by virulent and avirulent strains of <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>A.I.Borzilov, O.V.Korobova, T.I.Kombarova, E.S.Pereskokova, E.A.Ganina</i>	7
Development and quality evaluation of a semi-liquid modified Rappaport–Vasiliadis culture medium (MSRV medium) <i>A.Yu.Ivanova, O.V.Polosenko, M.V.Khramov</i>	17
A variant of the vaccine strain <i>Bacillus anthracis</i> STI-1 with hemolytic and lecithinase activities <i>L.I.Marinin, N.A.Shishkova, E.A.Tyurin, A.N.Mokrievich, I.A.Dyatlov</i>	23
Methodology for the detection of botulinum toxin type A on a triple quadrupole mass spectrometer <i>A.K.Surin, A.E.Evtyukhova, M.M.Rogozin, I.G.Shemyakin, V.V.Firstova</i>	30
Studying the growth properties of nutrient media and validation of methods for isolation of <i>Proteus</i> and <i>Providencia</i> bacteria from animal feed <i>A.A.Kremleva, O.V.Polosenko</i>	37
Affinity tags for recombinant protein purification <i>E.M.Mazurina, P.Kh.Kopylov, S.V.Dentovskaya</i>	43
Shelf life prediction of the dry agglutinating listeria serum <i>N.M.Andreevskaya, N.M.Khaptanova, Zh.A.Konovalova, N.G.Gefan, I.B.Vershinskaya, I.I.Baertueva, S.V.Balakhonov</i>	51
Immune status of children with coli infection caused by hemolytic <i>E. coli</i> <i>M.I.Yusupov</i>	56

Review Article

Chronic typhosis bacterious: problems and solutions <i>I.Kh.Mamatkulov, P.E.Ignatov, A.I.Mamatkulov, L.V.Kudasheva</i>	59
---	----

Problematic Article

Organization of the work of a covid diagnostic laboratory on the basis of a potentially hazardous biological facility <i>S.A.Blagodatskikh, E.A.Tyurin, A.E.Kurilova, M.V.Khramov</i>	62
--	----

Instructions for Authors	66
------------------------------------	----

О включении журнала «Бактериология» в перечень ВАК Минобрнауки России

Журнал «Бактериология» издается с 2016 г., и к настоящему времени выпущено 25 номеров. Предпосылками к созданию журнала в его нынешнем виде явились, с одной стороны, необходимость распространения новых научных знаний в области микробиологии при интенсификации научных исследований в данной области, а с другой – тенденция к значительному сокращению количества практических микробиологов, особенно медицинского профиля, при существующей системе клинической лабораторной диагностики.

ФБУН ГНЦ ПМБ, выполняющий большое количество научных исследований в области бактериологии, осуществляя в постоянном режиме диагностическую расшифровку этиологии сложных вспышек инфекционных болезней и обладая развитым масштабным производством микробиологических питательных сред (более 100 наименований с охватом около 50% рынка таких медицинских изделий в России), поставил себе задачу по поддержанию и развитию медицинской бактериологии в стране. С этой целью была сформирована концепция журнала «Бактериология» (такого журнала ни в России, ни в СССР не было), начал проводиться ежегодный Конгресс бактериологов (проведено 7 конгрессов) и создано Национальное научно-практическое общество бактериологов, включающее более 500 членов и респондентов соответствующего чата в сети Интернет – более 5000 участников. Такая триада – Журнал–Конгресс–Общество – позволила с первых же лет работы существенно интенсифицировать обмен в области научных достижений, прикладных разработок и внедрения методологий между специалистами – бактериологами.

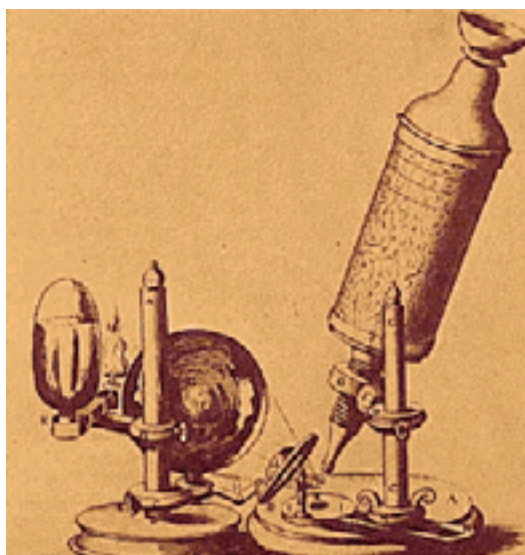
Специальности, по которым журнал «Бактериология» может публиковать научные работы, укладываются в следующий спектр:

- 1.5.6. Биотехнология (биологические науки)
- 1.5.11. Микробиология (биологические науки)
- 1.5.11. Микробиология (медицинские науки)
- 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика (биологические науки)
- 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика (медицинские науки).

Составляющие и предмет современной медицинской микробиологии и определяют основные рубрики журнала, к которым необходимо отнести следующие.

Живые культуры: свойства, выделение, хранение и использование, как основа для создания и поддержания коллекций, обеспечения диагностических исследований и биотехнологических процессов. В этой связи ГНЦ ПМБ участвовал в создании и продвижении четырех уже утвержденных правительственных документов, регламентирующих коллекционную деятельность. Одним из наиболее значимых элементов коллекций является создание Национального интерактивного каталога патогенных микроорганизмов и биотоксинов, как основы Национальной коллекции патогенов страны.

Биохимия микроорганизмов и иммунохимия – исследование факторов патогенности и иммуногенности для создания диагностических препаратов и средств специфической профилактики.



Молекулярная биология и генетика – регуляция экспрессии генов вирулентности и резистентности, широкое использование геномного редактирования. Применение достижений социомикробиологии, то есть результатов исследования поведения бактерий на популяционном уровне, когда с помощью общего для всей популяции субстрата, триггера или ингибирующего агента можно достигать конечной цели – элиминации вирулентных клеток, гибели всей популяции, удаления генов резистентности и т.п.

Инфекционная иммунология – исследование механизмов врожденного и индуцированного иммунитета к возбудителям болезней, что позволяет в короткие сроки создавать инновационные средства специфической профилактики.

Биотехнологические разработки – процессы создания и масштабирование производства диагностических, терапевтических средств и вакцин. Из фундаментальных направлений, которые освещает журнал, следует выделить изучение взаимоотношений микроорганизм-хозяин на молекулярном уровне, что является неперенным условием для новых разработок.

Важным направлением, но еще находящимся на первых этапах исследований, является изучение структуры нормальной микробиоты человека, взаимоотношений различных ее элементов и взаимодействия с патогенами.

Утвержденные для журнала специальности, относящиеся к общей и медицинской микробиологии, заставляют обратить внимание на вопрос, который часто поднимается в научных дискуссиях, но не имеет пока полной ясности. Это относится к содержанию термина «микробиология». Микробиология изучает живые организмы, невидимые невооруженным глазом. К таким организмам относятся прокариоты (зубактерии, архебактерии, сине-зеленые водоросли), эукариоты (грибы, растения, простейшие невидимые невооруженным глазом) и переходные формы типа динофлагеллят (у них нет выраженного ядра, но есть хромосомы). Возникает вопрос: относить ли вирусы к организмам, изучаемым микробиологией, или нет? Если да, то в чем смысл разделения в литературе терминов – микроорганизмы и вирусы (практически во всех научных изданиях и документах)? Даже в крупных монографиях последнего времени по вирусологии однозначного ответа на вопрос живые вирусы или не живые, найти невозможно, все очень размыто и неопределенно. Рабочее определение жизни, выработанное в научном мире на современном этапе, звучит так: «Жизнь – это химическая система, способная к дарвиновской эволюции». То, что вирусы – химическая система, сомнений не вызывает, их способность к эволюционированию (особенно патогенных для теплокровных) – тем более. В.М.Жданов и Д.К.Львов в своей работе «Место вирусов в биосфере» (2012 г.) пишут: «... вирусы являются полноценными организмами, обладая наследственностью в процессе воспроизведения себе подобных, изменчивостью (генетической и фенотипической) и подвергаясь в ходе эволюции естественному отбору». В связи с этим у меня нет сомнений в том, что вирусы живые организмы и не относить их к микробиологическим агентам нет оснований. Публикации же в журналах по микробиологическим специальностям научных работ по вирусам, а тем более, бактериофагам, могут быть вполне обоснованы.

В 2019 г. журнал «Бактериология» был включен в перечень ВАК Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертаций. С медицинскими учреждениями Узбекистана сложились тесные научные и практические связи журнала и ФБУН ГНЦ ПМБ. Практически ежегодно проводятся крупные межгосударственные научные конференции по инфекционным болезням и микробиологии. Это важное взаимодействие выражается и в получении значимых совместных научных результатов. Расширение связей журнала со странами СНГ и другими государствами является приоритетной задачей.

Одним из достоинств нашего журнала является то, что в нем публикуются обзорные статьи по методам выявления возбудителей отдельных инфекционных болезней, особенностям идентификации и спектру свойств штаммов патогенов одного вида. Это делает журнал настольной книгой для практических медицинских микробиологов, позволяя использовать отдельные номера как справочный материал в диагностической деятельности.

11.04.2023 г. журнал «Бактериология» включен в «Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук». Надеюсь, что новый статус журнала позволит еще более поднять его авторитет и будет способствовать развитию микробиологической науки в целом.

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

Мышиные модели пневмококкового сепсиса, вызываемого вирулентным и авирулентным штаммами *Streptococcus pneumoniae*

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

Разработаны две модели острого сепсиса у мышей линии BALB/c, вызываемого вирулентным и авирулентным штаммами пневмококка. Внутривентральное заражение модельных животных культурой штамма *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305 (вирулентный) в дозе 30 LD₅₀ вызывает 100%-ю гибель. Авирулентный штамм *S. pneumoniae* M17 также приводит к летальному исходу инфекции при внутривентральном заражении мышей в количестве 30 LD₅₀ в 2,5%-м растворе муцина. После заражения мышей штаммом M17 клетки бактерий в течение нескольких часов проникали в органы брюшной полости, легкие и головной мозг, вызывая в них патологические изменения воспалительно-некротического характера. Антибиотикотерапия пневмококкового сепсиса, вызванного обоими штаммами, продемонстрировала пригодность разработанных моделей. Экспериментальная пневмококковая инфекция поддается лечению антибиотиками, активными *in vitro* в отношении этих тест-штаммов. Пятидневное введение инфицированным мышам ампициллина (400 мг/кг/сутки) или левофлоксацина (120 мг/кг/сутки) обеспечивает 100%-ю выживаемость и санацию организма мышей от клеток пневмококка. Обе модели острой генерализованной инфекции, вызываемой штаммами ATCC 6305 и M17, являются удобным и наглядным инструментом для оценки эффективности *in vivo* антибактериальных препаратов различной природы.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, пневмококковая инфекция, мышиная модель, сепсис, экспериментальное лечение

Для цитирования: Борзилов А.И., Коробова О.В., Комбарова Т.И., Перескокова Е.С., Ганина Е.А. Мышиные модели пневмококкового сепсиса, вызываемого вирулентным и авирулентным штаммами *Streptococcus pneumoniae*. Бактериология. 2023; 8(1): 7–16. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-7-16

Mouse models of pneumococcus sepsis caused by virulent and avirulent strains of *Streptococcus pneumoniae*

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

Two models of acute sepsis in BALB/c mice caused by virulent and avirulent strains of pneumococcus have been developed. Intraperitoneal infection of model animals with a culture of the strain *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305 (virulent) at a dose of 30 LD₅₀ causes 100% death. The avirulent strain of *S. pneumoniae* M17 also leads to a lethal outcome of the infection when mice are infected intraperitoneally in an amount of 30 LD₅₀ in a 2.5% mucin solution. After infecting mice by the M17 strain, bacterial cells penetrated into the abdominal organs, lungs and brain within several hours, causing pathological changes of an inflammatory-necrotic nature in them. Antibiotic therapy of pneumococcal sepsis caused by both strains demonstrated the suitability of the developed models. Experimental pneumococcal infection is treatable by antibiotics active *in vitro* against these test strains. A five-day administration of ampicillin (400 mg/kg/day) or levofloxacin (120 mg/kg/day) to infected mice provides 100% survival and sanitation of mice from pneumococcal cells. Both models of acute generalized infection caused by strains ATCC 6305 and M17 are a convenient and illustrative tool for evaluating the *in vivo* efficacy of antibacterial drugs of various nature.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, pneumococcal infection, mouse model, sepsis, experimental treatment

For citation: Borzilov A.I., Korobova O.V., Kombarova T.I., Pereskokova E.S., Ganina E.A. Mouse models of pneumococcus sepsis caused by virulent and avirulent strains of *Streptococcus pneumoniae*. Bacteriology. 2023; 8(1): 7–16. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-7-16

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) 36-0147

Статья поступила 29.03.2023, принята к печати 28.04.2023

For correspondence:

Alexander I. Borzilov, MD, 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, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0147

The article was received 29.03.2023, accepted for publication 28.04.2023

S *treptococcus pneumoniae*, или пневмококки, представляют собой грамположительные каталазо- и оксидазо-отрицательные мелкие шаровидные или ланцетовидной формы бактерии, являющиеся факультативными анаэробами [1]. Они условно-патогенны для человека и представляют серьезную проблему для общественного здравоохранения во всем мире [2, 3]. Наиболее часто пневмококковая инфекция поражает детей и пожилых людей. Инвазивные формы инфекции, такие как бактериемия, менингит и пневмония, часто становятся причиной смерти людей [4, 5].

Основываясь на различиях в составе полисахаридных капсул, на сегодняшний день идентифицировано около 100 различных серотипов *S. pneumoniae* [2, 6]. Однако заболевания у человека вызывают лишь несколько серотипов, которые могут изменяться с течением времени, в зависимости от возрастной группы и географического региона [2, 7]. Вирулентность *S. pneumoniae* также связана с наличием полисахаридной капсулы, обеспечивающей антифагоцитарную активность. Среди других факторов патогенности у пневмококков отмечают протеин адгезии, протеазы секреторного IgA, тейхоевой кислоты и фрагменты пептидогликана, активизирующие комплемент по альтернативному типу [1, 2].

Основной путь передачи пневмококка от человека человеку – воздушно-капельный. Входными воротами пневмококковой инфекции является носоглотка, которую колонизируют бактерии *S. pneumoniae* [2, 8]. Колонизируя слизистую носоглотки, пневмококк может вызывать местные воспаления (синусит, отит) или, распространяясь кровотоком по организму человека, приводить к более серьезным проявлениям – бактериемии, пневмонии и менингиту [2, 9].

Бактерии *S. pneumoniae* имеют природную устойчивость к азтреонаму, теомоциллину, полимиксину В, налидиксовой кислоте, фузидиевой кислоте и аминогликозидам [1]. Лечение пневмококковой инфекции у людей нередко затруднено из-за циркуляции штаммов, обладающих полирезистентностью к лекарственным препаратам. С другой стороны, некоторые авторы отмечают чувствительность 90–100% изолятов *S. pneumoniae* к амоксициллину и к амоксициллину с клавулановой кислотой, а также к ципрофлоксацину [10], моксифлоксацину и ванкомицину [11]. Однако с каждым годом доля антибиотикочувствительных штаммов пневмококка уменьшается [11].

Для изучения патогенеза пневмококковой инфекции, факторов патогенности пневмококков, оценки эффективности средств специфической профилактики и этиологического лечения используют различные виды лабораторных животных – мышей, крыс, морских свинок, кроликов, нечеловекообразных обезьян [12]. Наиболее популярная животная модель пневмококковой инфекции – мышьяная. Линейные мыши (BALB/c, C57BL/6, DBA и CBA) применяются для воспроизведения пневмококковой пневмонии [13], сепсиса [14], менингита [15] и среднего отита [16]. Для этих же целей используют и аутбредных мышей, таких как MF1, CD-1 (Swiss), Swiss-Webster, NMRI [16–20]. Иногда для повышения чувствительности мышей к пневмококковой инфекции применяют нокаутных иммунодефицитных мышей, таких как CBA/N [20, 21], или аутбредных мышей с индуцированным иммунодефицитом [20].

Пневмококковую инфекцию индуцируют у мышей с помощью лабораторных и клинических штаммов *S. pneumoniae*

определенных серотипов. Так, например, сепсис у мышей воспроизводят с помощью штаммов пневмококка, относящихся к серотипу 3 [20–22], пневмонию – с использованием штаммов серотипов 3, 6, 9 и 16 [20, 22–24]. Штаммы серотипов 3 и 6 успешно применяют для моделирования пневмококкового менингита [25, 26].

Экспериментальный пневмококковый сепсис может вызываться внутривенным или внутрибрюшинным введением мышам культуры *S. pneumoniae*. Второй способ приводит к вторичному сепсису на фоне развивающегося перитонита. Мышиная модель септической пневмококковой инфекции является одной из наиболее применяемых. Следует отметить, что некоторые штаммы *S. pneumoniae* при внутрибрюшинном способе заражения вызывают гибель мышей, тогда как при внутривенном введении эти же культуры оказывались авирулентными [21, 27].

Начиная с 1980-х гг. внутривенную модель пневмококкового сепсиса у мышей активно применяют для изучения антительного ответа [28], факторов патогенности *S. pneumoniae* [18, 19, 29], для исследования эффективности пневмококковых вакцин [30, 31], комплексного ответа макроорганизма на инфекцию [20], для оценки активности *in vivo* антибактериальных препаратов (в том числе фаговых лизингов) [32]. Внутрибрюшинное заражение также давно и широко используется для индукции генерализованной пневмококковой инфекции у мышей. Эта модель хорошо себя зарекомендовала при изучении факторов вирулентности [33], исследовании роли цитокинов в развитии сепсиса [34], разработке перспективных вакцин [35], тестировании антибиотиков [36].

В наших исследованиях мы разработали две модели острого летального сепсиса и легочной пневмококковой инфекции у мышей линии BALB/c, пригодные для оценки эффективности *in vivo* антибактериальных препаратов. Обе модели являются летальными, но поддаются лечению препаратами, высокоактивными *in vitro* в отношении штаммов пневмококка.

Материалы и методы

Бактериальные культуры

Для моделирования пневмококкового сепсиса использовали два штамма *S. pneumoniae* из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk». Штамм ATCC 6305 (Инв. № В-7398) относится к серогруппе 5 и обладает высокой вирулентностью в отношении иммунокомпетентных мышей BALB/c при внутрибрюшинном введении ($LD_{50} = 10$ КОЕ). Штамм M17 (Инв. № В-9931) принадлежит серогруппе 20 и является авирулентным ($LD_{50} > 10^6$ КОЕ) для этих животных. Обе культуры пневмококка чувствительны к эритромицину, кларитромицину, азитромицину, линкомицину, клиндомицину, тетрациклину, левофлоксацину, спарфлоксацину, моксифлоксацину, гатифлоксацину, ванкомицину, рифампицину, хлорамфениколу и линезолиду. Минимальные подавляющие концентрации цефотаксима составляют 0,008 мкг/мл, ампициллина – <0,008 мкг/мл, меропенема – <0,004 мкг/мл, кларитромицина – <0,004 мкг/мл, левофлоксацина – 0,5 мкг/мл, ванкомицина – 0,063 мкг/мл, хлорамфеникола – 2–4 мкг/мл.

Питательные среды, антибиотики

Для выращивания культур *S. pneumoniae* использовали триптон-соевый агар (ТСА) (ФБУН ГНЦПМБ, Россия) с добавлением 5 дефибринированной крови и 0,1% глюкозы, а также шоколадный агар с ростовой добавкой (ФБУН ГНЦПМБ, Россия). Гомогенаты внутренних органов мышей и кровь высевали на ТСА (ФБУН ГНЦПМБ, Россия) с добавлением 5% гемолизированной крови и 0,1% глюкозы, а также шоколадный агар с селективной и ростовой добавками (ФБУН ГНЦПМБ, Россия).

Ампициллина натриевую соль (Pan Reac Appli Chem, Испания) и левофлоксацина гемигидрат (Dr. Reddy's, Индия) использовали для лечения экспериментальной пневмококковой инфекции у мышей.

Лабораторные животные

Для экспериментов *in vivo* использовали мышей линии BALB/c (самцы/самки, 16–19 г). Животных содержали в поликарбонатных клетках (Lab Products Inc., США) в помещениях со стандартными условиями микроклимата. Мыши имели постоянный доступ к воде и корму (ООО «Лабораторкорм»). Мышей содержали группами не более 6 животных в каждой и проводили за ними ежедневное ветеринарное наблюдение. Умерших в процессе эксперимента мышей удаляли из клеток по мере обнаружения.

Заражение лабораторных животных

Бактериальную взвесь для инфицирования животных готовили из ночной агаровой культуры. Выросшие культуры суспендировали в физиологическом растворе (0,85%-й хлорид натрия). Взвеси доводили до плотности 3,8 по стандарту оптической мутности (по МакФарланду), что приблизительно соответствует 1×10^8 КОЕ/мл. Затем делали последовательные разведения суспензий до достижения необходимой концентрации бактерий. Культуры вводили мышам внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл. Для инъекций использовали инсулиновые шприцы с иглой диаметром 26–28 G. Контроль количества клеток во взвеси осуществляли путем посева по 0,1 мл из соответствующих разведений исходной взвеси на ТСА с добавлением 5% гемолизированной крови и 0,1% глюкозы. Посевы инкубировали в течение 24 ч при температуре 36,5°C.

Изучение динамики развития пневмококкового сепсиса

Для моделирования пневмококкового сепсиса культуру *S. pneumoniae* ATCC 6305 вводили внутрибрюшинно мышам линии BALB/c в дозе 30 LD₅₀ (3×10^2 КОЕ). Штамм M17 вводили мышам в растворе 2,5%-го муцина в количестве 30 LD₅₀ ($1,2 \times 10^4$ КОЕ).

Динамику развития летальной пневмококковой инфекции у мышей оценивали по степени специфической бактериальной обсемененности паренхиматозных органов и уровню бактериемии через 1,5, 3, 6, 12 и 24 ч после внутрибрюшинного заражения. В каждый временной интервал по 5 животных эвтаназируют и отбирали селезенку, легкие, почки, мозг и кровь для проведения количественного бактериологического анализа. Для выявления клеток пневмококка в гомогенатах органов и крови использовали плотную питательную среду для выделения пневмококков из цельных суспензий –

шоколадный агар с селективной и ростовой добавками. Десятикратные разведения высевали на ТСА с добавлением 5% гемолизированной крови и 0,1% глюкозы. Посевы инкубировали при температуре 36,5°C в течение 24–48 ч.

Для выявления функциональных и морфологических изменений внутренних органов в процессе развития генерализованной пневмококковой инфекции через 24 ч после инфицирования делали общий и биохимический анализ крови экспериментальных животных. В это же время проводили гистологическое исследование органов мышей (селезенки, легких, печени, мозга, регионарных лимфатических узлов и тимуса).

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. Исследовали индивидуальные образцы крови от 5 животных в группе.

Биохимический анализ крови

Уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатамино-трансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), общего белка, глюкозы и креатинина в сыворотках крови мышей определяли на полуавтоматическом биохимическом анализаторе StatFax-3300 (Awareness Technology, США) с использованием реактивов UTS (ООО «Юнимед», Россия). Для анализа использовали индивидуальные сыворотки крови от 5 подопытных мышей.

Бактериологический анализ органов

Животных эвтаназируют методом декапитации, а затем вскрывали для получения образцов органов. Селезенку, почки, легкие и головной мозг мышей растирали в стерильных фарфоровых ступках с добавлением кварцевого песка. В гомогенаты добавляли 1 мл стерильного физиологического раствора и перемешивали до получения однородной суспензии. Полученные суспензии (цельные и их десятикратные разведения) высевали на поверхность питательного агара. Для выявления культуры пневмококка использовали шоколадный агар с селективной и ростовой добавками и ТСА с добавлением 5% гемолизированной крови и 0,1% глюкозы. Посевы инкубировали при температуре 36,5°C в течение 18–24 ч.

Гистологическое исследование органов и тканей

Гистологическое исследование проводили через 24 ч после внутрибрюшинного заражения (на пике сепсиса). В качестве контролей использовали интактных мышей линии BALB/c. После эвтаназии у животных препарировали селезенку, легкие, печень, головной мозг, регионарные лимфатические узлы и тимус.

Полученные образцы помещали во флакон с 50 мл 4%-го раствора параформа. Через 24 ч экспозиции раствор параформа заменяли свежей порцией. Исследованию подвергали гистологические срезы органов, окрашенные гематоксилином и эозином по стандартной методике. Анализ гистологических препаратов проводили с использованием микроскопа

Nikon Elipse 80i и программы анализа изображения NIS Elements F4.60.00. Определяли наличие признаков воспалительно-некротических изменений в исследуемых образцах.

Антибиотикотерапия летального пневмококкового сепсиса

Пригодность разработанной модели пневмококковой инфекции оценивали в экспериментах по антибиотикотерапии. В качестве антибактериальных препаратов использовали ампициллин и левофлоксацин, активные *in vitro* против тест-штаммов пневмококка.

Сепсис вызывали у интактных мышей линии BALB/c, заражая их внутрибрюшинно летальной дозой (30 LD₅₀) штамма *S. pneumoniae* ATCC 6305 или штамма *S. pneumoniae* M17 (с муцином). После инфицирования животные были рандомизированы на 4 лечебные и 1 контрольную группы по 10 особей в каждой. Мышей из 1-й и 2-й групп лечили ампициллином (200 мг/кг) 2 раза в день подкожно. Терапию начинали через 3 ч (экстренное лечение) и 12 ч (позднее лечение) соответственно и продолжали в течение 5 дней. Мыши из 3-й и 4-й групп получали подкожно левофлоксацин (60 мг/кг) дважды в день. Продолжительность лечения составляла 5 дней. Начало лечения – через 3 и 12 ч после заражения соответственно. Группа 5 являлась контрольной и не получала антибактериальных препаратов. Срок наблюдения за мышами – 14 суток. Эффективность антибиотикотерапии оценивали по выживаемости и степени санации организма выживших животных от культуры соответствующего тест-штамма.

Статистические методы

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерных программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 10.

Результаты и обсуждение

Модель летального пневмококкового сепсиса у мышей

Внутрибрюшинное заражение мышей линии BALB/c культурой *S. pneumoniae* ATCC 6305 или *S. pneumoniae* M17 (с муцином) в дозе 30 LD₅₀ вызывает быстрое развитие сепсиса и 100%-ю гибель животных в течение 2–5 суток.

Результаты бактериологического анализа

Через 3 ч после инфицирования клетки пневмококка не обнаруживались ни в крови, ни в паренхиматозных органах, ни в головном мозге животных (табл. 1). Через 6 ч культура штамма ATCC 6305 появлялась в небольших количествах в крови, селезенке и почках большинства животных. Затем сепсис нарастал, и к 12-му часу инфекции концентрация клеток патогена в крови, селезенке и почках достигала высоких значений. В это же время пневмококки уже обнаруживались в легких и головном мозге зараженных животных. Через сутки после инфицирования пневмококковая инвазия селезенки, легких и почек достигала своего максимума. Приблизительно на 2 порядка увеличивалась концентрация бактерий *S. pneumoniae* ATCC 6305 в головном мозге и крови мышей линии BALB/c.

Авирулентный штамм *S. pneumoniae* M17 также вызывал быструю генерализацию пневмококковой инфекции у мышей линии BALB/c. Уже через 3 ч после внутрибрюшинного введения культуры в растворе муцина пневмококки обнаруживались в крови, почках и селезенке всех инфицированных мышей (табл. 2). По прошествии 6 ч бактерии *S. pneumoniae* M17 проникали в легкие и головной мозг. В это же время значительно повышался уровень обсемененности органов, нарастала бактериемия. Через 24 ч сепсис достигал своего

Таблица 1. Обсемененность селезенки, легких, головного мозга, почек и крови мышей линии BALB/c бактериями *S. pneumoniae* ATCC 6305 в различные сроки острой пневмококковой инфекции, обусловленной внутрибрюшинным заражением в дозе 30 LD₅₀

Время после заражения, ч	LOG10 КОЕ/г (мл)				
	селезенка	легкое	головной мозг	почки	кровь
1,5	<1	<1	<1	<1	<1,1
3	<1	<1	<1	<1	<1,1
6	3,10 ± 0,50 (5/5)	<1	<1	2,27 ± 0,34 (3/5)	2,74 ± 1,00 (5/5)
12	4,91 ± 0,49 (5/5)	4,72 ± 0,37 (5/5)	2,95 ± 0,39 (3/5)	4,42 ± 0,54 (5/5)	4,79 ± 0,41 (5/5)
24	7,52 ± 0,41 (5/5)	6,78 ± 0,43 (5/5)	4,52 ± 0,46 (5/5)	7,04 ± 0,44 (5/5)	6,27 ± 0,36 (5/5)

Представлены средние значения и стандартные отклонения (n = 5); в дробях указано соотношение количества животных, у которых была выявлена культура *S. pneumoniae* ATCC 6305, к общему количеству животных в группе.

Таблица 2. Обсемененность селезенки, легких, головного мозга, почек и крови мышей линии BALB/c бактериями *S. pneumoniae* M17 в различные сроки острой пневмококковой инфекции, обусловленной внутрибрюшинным заражением в дозе 30 LD₅₀

Время после заражения, ч	LOG10 КОЕ/г (мл)				
	селезенка	легкое	головной мозг	почки	кровь
1,5	<1	<1	<1	<1	<1,1
3	3,90 ± 0,20 (5/5)	<1	<1	3,61 ± 0,20 (5/5)	3,33 ± 0,18 (5/5)
6	5,92 ± 0,19 (5/5)	4,17 ± 0,38 (5/5)	3,55 ± 0,19 (5/5)	6,05 ± 0,38 (3/5)	5,49 ± 0,32 (5/5)
12	7,93 ± 0,19 (5/5)	5,62 ± 0,55 (5/5)	5,94 ± 0,60 (3/5)	7,58 ± 0,35 (5/5)	7,93 ± 0,54 (5/5)
24	7,73 ± 0,60 (5/5)	5,89 ± 0,17 (5/5)	6,21 ± 0,72 (5/5)	7,64 ± 0,64 (5/5)	7,98 ± 0,64 (5/5)

Представлены средние значения и стандартные отклонения (n = 5); в дробях указано соотношение количества животных, у которых была выявлена культура *S. pneumoniae* M17, к общему количеству животных в группе.

Таблица 3. Результаты клинического анализа крови мышей BALB/c, сделанного через 24 ч после внутрибрюшинного введения 30 LD₅₀ культур *S. pneumoniae*

Показатель	Ед. измерения	Контроль	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6305	<i>p</i> -value*	Контроль	<i>S. pneumoniae</i> M17	<i>p</i> -value*
Лейкоциты	×10 ⁹ /л	4,6 ± 1,1	1,8 ± 1,0	<0,003	7,8 ± 1,1	2,7 ± 1,2	<0,002
Лимфоциты	×10 ⁹ /л	2,6 ± 1,0	0,7 ± 0,5	<0,02	5,7 ± 0,6	1,9 ± 0,9	<0,0003
Моноциты	×10 ⁹ /л	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	>0,05	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1	<0,009
Гранулоциты	×10 ⁹ /л	1,8 ± 0,7	1,0 ± 0,6	>0,05	1,8 ± 0,5	0,8 ± 0,7	<0,04
Лимфоциты	%	54,7 ± 16,2	39,0 ± 8,6	>0,05	73,2 ± 3,4	71,9 ± 19,5	>0,05
Моноциты	%	5,1 ± 2,3	6,3 ± 2,0	>0,05	3,4 ± 0,1	2,6 ± 1,3	>0,05
Гранулоциты	%	40,2 ± 14,0	54,8 ± 8,0	>0,05	23,4 ± 3,3	25,5 ± 18,7	>0,05
Эритроциты	×10 ¹² /л	7,58 ± 1,60	9,89 ± 0,47	<0,03	8,36 ± 0,18	9,16 ± 0,58	<0,02
Гемоглобин	г/л	105 ± 24	144 ± 12	<0,02	128 ± 4	135 ± 8	>0,05
Гематокрит	%	34,8 ± 6,1	45,9 ± 4,2	<0,02	39,0 ± 0,3	41,0 ± 2,3	>0,05
Тромбоциты	×10 ⁹ /л	616 ± 133	323 ± 108	<0,006	612 ± 166	220 ± 45	<0,006
Тромбоцитрит	%	0,258 ± 0,045	0,147 ± 0,052	<0,008	0,278 ± 0,163	0,119 ± 0,024	<0,008

Представлены средние значения и стандартные отклонения (*n* = 5); * уровень значимости отличий от контроля для выбранной временной точки; жирным шрифтом указаны значения, статистически значимо отличающиеся от контроля; все сравнения проводили по двустороннему *t*-критерию Стьюдента.

пика: концентрация *S. pneumoniae* M17 в них была максимальной.

Результаты общего анализа крови

Общий анализ крови мышей, зараженных штаммом *S. pneumoniae* ATCC 6305, показал, что через сутки у мышей развивается лейкоцитопения и лимфоцитопения. Общее количество лейкоцитов и лимфоцитов достоверно снижалось по сравнению с контрольной группой неинфицированных животных (табл. 3). В то же время наблюдалось повышение концентрации эритроцитов в крови и увеличение гематокрита. Среди других статистически значимых (*p* < 0,008) изменений у инфицированных животных следует отметить почти двукратное снижение уровня тромбоцитов и, как следствие, понижение тромбоцитрита.

В случае штамма *S. pneumoniae* M17 инфекция также вызывала у мышей существенное снижение количества клеток белой крови – лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов – по сравнению с контролем (табл. 3). В то же время наблюдалось достоверное повышение количества эритроци-

тов и уменьшение концентрации тромбоцитов. Других заметных изменений в формуле крови инфицированных животных не было выявлено.

Результаты биохимического анализа крови

Биохимический анализ сывороток крови мышей, инфицированных внутрибрюшинно культурой *S. pneumoniae* ATCC 6305, проведенный через 24 ч после заражения, выявил значительное повышение уровня общего белка и креатинина по сравнению с контрольными мышами. Кроме того, было замечено незначительное повышение уровня АСТ. С другой стороны, у животных в 1,5–1,7 раза снижалось содержание глюкозы, АЛТ и ЩФ.

Для штамма *S. pneumoniae* M17 было характерным снижение в 3 раза по сравнению с контролем уровня глюкозы и некоторое уменьшение количества общего белка. В 3,7 и 3,1 раза по сравнению с интактным контролем повышалось содержание АСТ и АЛТ. Показатели уровня креатинина и ЩФ оставались на уровне контроля (табл. 4).

Данные гистологических исследований

Через 24 ч после внутрибрюшинного заражения мышей штаммами *S. pneumoniae* ATCC 6305 и *S. pneumoniae* M17 в дозе 30 LD₅₀ было проведено гистологическое исследование внутренних органов мышей (паховые лимфатические узлы, селезенка, тимус, печень, почки, легкие, головной мозг) с целью выявления патоморфологических изменений.

Штамм *S. pneumoniae* ATCC 6305

Микроскопические изменения в паховых лимфатических узлах мышей линии BALB/c, инфицированных *S. pneumoniae* ATCC 6305, ограничены корковой зоной. Отмечается уменьшение ширины корковой зоны, в которой снижено количество лимфоцитов, а также уменьшение величины лимфатических фолликулов. В середине фолликулов, на месте центров размножения, сохраняются преимущественно клетки ретикуло-макрофагальной стромы, лимфоциты исчезают. Некоторое количество лимфоцитов разрушилось с образованием скоплений апоптотных тел. Мозговая зона занимает

Таблица 4. Результаты биохимического анализа крови мышей BALB/c, сделанные через 24 ч после внутрибрюшинного введения 30 LD₅₀ культур *S. pneumoniae*

Показатель	Контроль	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6305	Контроль	<i>S. pneumoniae</i> M17
Общий белок, г/л	77,8 ± 7,4	103,6 ± 1,1	81,1 ± 5,7	73,9 ± 3,1
Г л у к о з а , ммоль/л	4,02 ± 0,59	2,61 ± 0,50	7,23 ± 0,62	2,27 ± 0,31
АСТ, МЕ/л	131,1 ± 22,2	166,7 ± 7,9	169,4 ± 2,8	631,7 ± 25,6
АЛТ, МЕ/л	46,2 ± 6,7	28,5 ± 9,4	40,0 ± 9,9	126,3 ± 58,1
Креатинин, мкмоль/л	36,5 ± 0,4	181,7 ± 2,1	41,9 ± 0,9	44,1 ± 5,4
ЩФ, МЕ/л	408,9 ± 105,7	244,5 ± 1,4	358,0 ± 57,0	326,8 ± 72,8

Представлены средние значения и стандартные отклонения (*n* = 5); жирным шрифтом указаны значения, статистически значимо отличающиеся от контроля; все сравнения проводили по двустороннему *t*-критерию Стьюдента.

основную площадь лимфатических узлов и плотно заполнена лимфоцитами.

В селезенке мышей белая пульпа состоит из множества крупных лимфатических фолликулов, в которых отсутствует маргинальная (краевая) зона и образуется заметная граница с красной пульпой в виде светлой полосы, состоящей из клеток ретикуло-макрофагальной стромы без инфильтрации лимфоцитами. Красная пульпа гиперемирована, содержит множество эритроцитов. В синусоидах красной пульпы имеется большое количество базофильно окрашенных частиц разной величины, образующихся в результате массовой гибели ядродержащих клеток. Среди погибших клеток определяются единичные лимфоциты.

У инфицированных мышей, как и у интактных животных, в дольках тимуса сохраняется разделение на корковую зону с большим количеством лимфоцитов и мозговую зону – с меньшим количеством лимфоцитов. В корковой зоне тимуса выявлены патологические изменения, которые выражаются в массовой гибели лимфоцитов с образованием мелкоочаговых скоплений апоптозных тел среди плотно расположенных лимфоцитов.

В паренхиме печени инфицированных мышей встречаются обширные участки, состоящие из гепатоцитов с признаками дегенерации. Ядра гепатоцитов сжаты, имеют значительно меньшую величину, чем в клетках паренхимы, окружающей очаг. Изменяется окраска цитоплазмы клеток, уменьшается их размер. Выявлена патология в кровеносной системе печени: на срезах вен видны обширные тромбы, которые обнаруживаются внутри некротических участков в паренхиме.

Штамм *S. pneumoniae* M17

При микроскопии гистологических срезов лимфатических узлов мышей, зараженных культурой *S. pneumoniae* M17, было обнаружено, что основная площадь узлов представлена клетками ретикуло-макрофагальной стромы. Лимфоциты сохраняются в виде узких малоклеточных тяжей между клетками стромы. Лимфатические фолликулы отсутствуют.

В селезенке мышей отмечается резкая гиперемия красной пульпы. В синусах красной пульпы преобладают эритроциты. Имеется небольшое количество лимфоцитов и нейтрофилов и некоторое количество базофильно окрашенного некротического субстрата. Белая пульпа занимает большую площадь. Центры размножения не выражены. По всей площади белой пульпы обнаруживаются небольшие очаги из погибших клеток в виде скоплений апоптозных тел.

Через сутки после заражения культурой *S. pneumoniae* M17 у мышей значительно уменьшался размер тимуса по сравнению с интактными мышами. Микроскопическое исследование показало, что в дольках тимуса корковая зона – место пролиферации тимоцитов – заметно уменьшена и сохраняется в виде узкой полосы по краю долек. В области корковой зоны имеется скопление апоптозных тел, что указывает на гибель лимфоцитов в тимусе.

В печени выявлены обширные очаги некроза, которые не имеют отчетливой границы и постепенно переходят в окружающую паренхиму из гепатоцитов, имеющих нормальное строение. Некротизированная ткань состоит из лизированных клеток: границы клеток и ядер не определяются. В некоторых клетках сохраняются измененные мелкие ядра на фоне разрушенной цитоплазмы.

В почках, легких и головном мозге мышей, инфицированных тест-штаммами пневмококка, не выявлено микроскопических отклонений от нормы.

Антибиотикотерапия экспериментального пневмококкового сепсиса

Пригодность разработанных нами моделей пневмококкового сепсиса у мышей BALB/c, обусловленного *S. pneumoniae* ATCC 6305 и *S. pneumoniae* M17, оценивали в экспериментах по его лечению. Летальную пневмококковую инфекцию моделировали на мышах линии BALB/c, которых заражали внутрибрюшинно тест-штаммами в дозе 30 LD₅₀. В качестве антибактериальных препаратов для лечения летального сепсиса использовали высоко активные *in vitro* против этих бактерий ампициллин (минимальная подавляющая концентрация (МПК) <0,008 мкг/мл) и левофлоксацин (МПК 0,5 мкг/мл).

Результаты антибиотикотерапии показали высокую активность ампициллина и левофлоксацина как при раннем начале лечения (через 3 ч после заражения), когда сепсис еще не развился, так и в случае позднего начала (через 12 ч после заражения), когда генерализация инфекции достигала высокого уровня. Все мыши, инфицированные штаммом ATCC 6305 и получавшие в ампициллин или левофлоксацин, оставались живыми в течение 14 суток после заражения. 100% контрольных животных (без лечения) пали в течение 4 суток после заражения, причем 9 из 10 умерли на 2-е сутки.

Из внутренних органов всех павших мышей была выделена культура патогена – *S. pneumoniae* ATCC 6305. По данным бактериологического анализа внутренних органов и крови все выжившие мыши не были носителями пневмококковой инфекции, то есть были полностью санированы от клеток тест-штамма.

Аналогичные результаты были получены в результате антибиотикотерапии пневмококковой инфекции у мышей BALB/c, вызванной внутрибрюшинным введением авирулентного штамма *S. pneumoniae* M17 в растворе муцина. Пятидневный курс лечения ампициллином или левофлоксацином независимо от срока начала терапии защищал от гибели всех инфицированных животных. Следует отметить, что выжившие мыши не были носителями *S. pneumoniae* M17. В то же время все животные из контрольной группы погибали в период со 2-х по 12-е сутки, а 70% из них умерли через 2 дня после заражения. Бактериологический анализ внутренних органов всех павших мышей выявил наличие культуры тест-штамма.

Для оценки эффективности различных препаратов, предназначенных для профилактики и лечения бактериальных инфекций, важно иметь работоспособные и воспроизводимые животные модели. Особенно удобными и наглядными являются летальные экспериментальные инфекции, поскольку позволяют получить наиболее убедительную информацию о терапевтическом действии препаратов по показателям выживаемости и санации организма модельных животных от возбудителя экспериментальной инфекции. Среди лабораторных животных чаще других используются мыши, благодаря их относительно невысокой стоимости и доступности. В своих исследованиях мы также с успехом использо-

вали мышинные модели экспериментального сепсиса различной этиологии [37–42].

В данной статье описаны модели острого пневмококкового сепсиса у инбредных мышей, вызываемые штаммами *S. pneumoniae* ATCC 6305 и *S. pneumoniae* M17 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск». Штамм ATCC 6305 был наиболее вирулентным для мышей линии BALB/c среди нескольких других штаммов. Показатель его LD₅₀ при внутрибрюшинном заражении животных составляет 10 КОЕ. Аутбредные мыши оказались менее чувствительными (LD₅₀ >1 × 10⁶ КОЕ) к этому штамму. Другой тест-штамм – *S. pneumoniae* M17 – был авирулентным в отношении аутбредных мышей и мышей линии BALB/c (LD₅₀ >1 × 10⁶ КОЕ). Для повышения чувствительности мышей к этой культуре пневмококка мы вводили бактериальную взвесь внутрибрюшинно в растворе 2,5%-го муцина. Этот препарат подавляет функциональную активность макрофагов, что способствует развитию инфекции у модельных животных [43]. Такой подход позволил нам повысить вирулентность штамма M17 (LD₅₀ = 400 КОЕ) для мышей линии BALB/c. Во всех экспериментах по моделированию пневмококкового сепсиса и его лечению мы использовали инбредных мышей линии BALB/c, как и другие исследователи [12].

Экспериментальный пневмококковый сепсис у мышей вызывали путем внутрибрюшинного введения культуры штаммов ATCC 6305 или M17 (с муцином) в количестве 30 LD₅₀, что составило 3 × 10² и 1,2 × 10⁴ КОЕ соответственно. Эта заражающая доза вызывает гибель у 100% инфицированных животных. Таким образом, оба штамма – вирулентный и авирулентный – оказались пригодными для моделирования летальной пневмококковой инфекции. Бактериологический анализ внутренних органов показал, что в случае штамма *S. pneumoniae* ATCC 6305 генерализация пневмококковой инфекции начинается промежутке времени от 3 до 6 ч, когда культура патогена колонизирует селезенку и почки. В это же время у животных появляется бактериемия. К 12 ч клетки патогена проникают в легкие и головной мозг. Через сутки после инфицирования обсемененность селезенки, легких, головного мозга, почек и крови пневмококками штамма ATCC 6305 достигает своего максимума, начинается гибель мышей.

При заражении мышей культурой *S. pneumoniae* M17 наблюдалась похожая динамика развития пневмококкового сепсиса, с той лишь разницей, что диссеминация патогена в организме мышей начиналась уже через 3 ч после внутрибрюшинного инфицирования. К этому времени клетки тест-штамма проникали в селезенку, почки и кровь. В дальнейшем (через 6 ч) культура распространялась в легкие и головной мозг. Концентрация клеток пневмококка в органах и тканях продолжала расти в течение суток. Интенсивная генерализация пневмококковой инфекции, обусловленной штаммом M17, также приводит к раннему началу гибели мышей.

Быстрое развитие пневмококкового сепсиса у мышей приводит к характерным для инфекционного заболевания изменениям гомеостаза. Среди гематологических показателей наиболее выраженными являются лейкопения и тромбоцитопения. Следует отметить, что через сутки после зараже-

ния у мышей выявляются значительные отклонения от нормы некоторых биохимических показателей: АЛТ, АСТ, глюкозы. В случае штамма *S. pneumoniae* ATCC 6305 было отмечено также отклонение в показателях общего белка, ЩФ и креатинина. Результаты биохимического анализа вывороток крови мышей свидетельствуют о серьезных функциональных нарушениях печени, поджелудочной железы, почек. Таким образом, у инфицированных животных развивается прогрессирующая полиорганная недостаточность, которая наряду с интоксикацией приводит к летальному исходу.

Через сутки после внутрибрюшинного заражения культурой *S. pneumoniae* ATCC 6305 или *S. pneumoniae* M17 у мышей развиваются патологические изменения в органах иммунной системы (лимфатические узлы, селезенка, тимус). В отличие от авирулентного штамма M17, у мышей, инфицированных вирулентным штаммом ATCC 6305, в лимфоузле и тимусе обнаружен апоптоз лимфоцитов. Оба штамма вызывают в красной пульпе селезенки накопление эритроцитов, а также разрушение ядросодержащих клеток. Микроскопический анализ образцов селезенки мышей, зараженных вирулентным штаммом пневмококка, выявил большее количество базофильно окрашенных некротических частиц в красной пульпе. Оба штамма вызывают образование обширных некрозов в паренхиме печени мышей. Существенным отличием патологического действия вирулентного штамма является образование тромбов в венозных сосудах печени, вокруг которых локализуются участки некрозов. Таким образом, данные гистологических исследований говорят о том, что пневмококковый сепсис у мышей приводит к быстрым и тяжелым патологическим изменениям в органах, что, в свою очередь, нарушает их функцию и приводит к гибели животных.

Пригодность разработанных моделей мы оценили в экспериментах по антибиотикотерапии пневмококкового сепсиса. Для лечения использовали антибиотики ампициллин и левофлоксацин. Дозы препаратов для мышей были эквивалентны человеческим и рассчитаны с учетом соответствующего коэффициента [44]. Пятидневные курсы терапии начинали в разные периоды экспериментальной пневмококковой инфекции: до начала генерализации (1,5 ч после заражения) и в разгар сепсиса (через 12 ч после заражения). Результаты антибиотикотерапии показали, что все животные, получавшие антибиотики, в течение 5 дней остались живыми и санированными от бактерий *S. pneumoniae* ATCC 6305 и *S. pneumoniae* M17. В то же время смертность в контрольных группах (без лечения) составляла 100%.

Заключение

В результате работы были изучены и предложены для практического применения две модели летального пневмококкового сепсиса, вызываемого вирулентным и авирулентным штаммами *S. pneumoniae*. Эти модели поддаются лечению антибиотиками и могут быть использованы для оценки лечебной эффективности различных антибактериальных препаратов, предназначенных для борьбы с пневмококковой инфекцией.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Funding information

The work was carried out within the framework of the industry 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

- MP 4.2.0114-16. Лабораторная диагностика внебольничной пневмонии пневмококковой этиологии. 2017; 64 с.
- Pneumococcal Conjugate Vaccines in Infants and Children Under 5 Years of Age: WHO position paper – February 2019. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/310968/WER9408.pdf?ua=1>
- Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16 (6):355-367. DOI: 10.1038/s41579-018-0001-8
- Hanquet G, Krizova P, Valentiner-Branth P, Ladhani SN, Nuorti JP, Lepoutre A, et al., Pastore Celentano L, Savulescu C; SplIDnet/I-MOVE+ Pneumo Group. Effect of childhood pneumococcal conjugate vaccination on invasive disease in older adults of 10 European countries: implications for adult vaccination. *Thorax*. 2019 May;74(5):473-482. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2018-211767
- Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*. 2007 Mar 23;82(12):93-104.
- Ganaie F, Saad JS, McGee L, van Tonder AJ, Bentley SD, Lo SW, et al. A New Pneumococcal Capsule Type, 10D, is the 100th Serotype and Has a Large cps Fragment from an Oral *Streptococcus*. *mBio*. 2020 May 19;11(3):e00937-20. DOI: 10.1128/mBio.00937-20
- Namkoong H, Ishii M, Funatsu Y, Kimizuka Y, Yagi K, Asami T, et al. Theory and strategy for Pneumococcal vaccines in the elderly. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(2):336-43. DOI: 10.1080/21645515.2015.1075678
- Bogaert D, De Groot, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*. 2004;4(3):144-154. DOI: 10.1016/S1473-3099(04)00938-7
- Faden, H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *Tonawanda/Williamsville pediatrics*. *J Infect Dis*. 1997;175(6):1440-1445. DOI: 10.1086/516477
- Zafar A, Hasan R, Nizamuddin S, Mahmood N, Mukhtar S, Ali F, et al. Antibiotic susceptibility in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pyogenes* in Pakistan: a review of results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2002-15. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(1):103-9. DOI: 10.1093/jac/dkw076
- Larsson M, Nguyen HQ, Olson L, Tran TK, Nguyen TV. Multi- drug resistance in *Streptococcus pneumoniae* among children in rural Vietnam more than doubled from 1999 to 2014. *Acta Paediatrica*. 2021;110(6):1916-1923. DOI: 10.1111/apa.157
- Chiavolini D, Pozzi G, Ricci S. Animal models of *Streptococcus pneumoniae* disease. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Oct;21(4):666-85. DOI: 10.1128/CMR.00012-08
- Ramisse F, Binder P, Szatanik M, Alonso JM. Passive and active immunotherapy for experimental pneumococcal pneumonia by polyvalent human immunoglobulin or F(ab')₂ fragments administered intranasally. *J Infect Dis*. 1996;173(5):1123-8. DOI: 10.1093/infdis/168.4.1030
- Iannelli F, Chiavolini D, Ricci S, Oggioni MR, Pozzi G. Pneumococcal surface protein C contributes to sepsis caused by *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Infect Immun*. 2004;72(5):3077-80. DOI: 10.1128/IAI.72.5.3077-3080.2004
- Grandgirard D, Steiner O, Täuber MG, Leib SL. An infant mouse model of brain damage in pneumococcal meningitis. *Acta Neuropathol*. 2007 Dec;114(6):609-17. DOI: 10.1007/s00401-007-0304-8
- Melhus Å, Ryan AF. A mouse model for acute otitis media. *APMIS*. 2003;111(10):989-94. DOI: 10.1034/j.1600-0463.2003.1111012.x
- Kadioglu A, Taylor S, Iannelli F, Pozzi G, Mitchell TJ, Andrew PW. Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by deficiency of pneumolysin and by differences in serotype. *Infect Immun*. 2002;70(6):2886-2890. DOI: 10.1128/IAI.70.6.2886-2890.2002
- Iannelli F, Chiavolini D, Ricci S, Oggioni MR, Pozzi G. Pneumococcal surface protein C contributes to sepsis caused by *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Infect Immun*. 2004;72(5):3077-80. DOI: 10.1128/IAI.72.5.3077-3080.2004
- Chiavolini D, Tripodi S, Parigi R, Oggioni MR, Blasi E, Cintonino M, et al. Method for inducing experimental pneumococcal meningitis in outbred mice. *BMC Microbiol*. 2004;4(36). DOI: 10.1186/1471-2180-4-36
- Wang E, Ouellet N, Simard M, Fillion I, Bergeron Y, Beauchamp D, Bergeron MG. Pulmonary and systemic host response to *Streptococcus pneumoniae* and *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in normal and immunosuppressed mice. *Infect Immun*. 2001;69(9):5294-304. DOI: 10.1128/IAI.69.9.5294-5304.2001
- Briles DE, Crain MJ, Gray BM, Forman C, Yother J. Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 1992;60(1):111-6. DOI: 10.1128/iai.60.1.111-116.1992
- Soriano F, Ponte C, Nieto E, Parra A. Correlation of *in vitro* activity and pharmacokinetics parameters with *in vivo* effect of amoxicillin, co-amoxiclav and cefotaxime in a murine model of pneumococcal pneumonia. *J Antimicrob Chemother*. 1996;38(2):227-36. DOI: 10.1093/jac/38.2.227
- Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC, Ades EW, Novak L, Van Ginkel FW, Benjamin WH. Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*. 2003;188(3):339-48. DOI: 10.1086/376571
- Azoulay-Dupuis E, Bédos JP, Vallee E, Hardy DJ, Swanson RN, Pocidallo JJ. Antipneumococcal activity of ciprofloxacin, oxofloxacin and temafloxacin in an experimental mouse pneumonia model at various stages of the disease. *J Infect Dis*. 1991;163(2):319-24. DOI: 10.1093/infdis/163.2.319
- Zwijnenburg PJG, van der Poll T, Florquin S, van Deventer SJH, Roord JJ, van Furth Experimental pneumococcal meningitis in mice: a model of intranasal infection. *Infect Dis*. 2001;183(7):1143-6. DOI: 10.1086/319271
- Bhatt S, Halpin C, Hsu W, Thedinger BA, Levine RA, Tuomanen E, Nadol JBJ. Hearing loss and pneumococcal meningitis: an animal model. *Laryngoscope*. 1991;101(12Pt1):1285-92. DOI: 10.1002/lary.5541011206
- Briles DE, Nahm MH, Schroer K, Davie J, Baker P, Kearney J, Barletta R. Antiphosphocholine antibodies found in normal mouse serum are protective against intravenous infection with type 3 *Streptococcus pneumoniae*. *J Exp Med*. 1981;153(3):694-705. DOI: 10.1084/jem.153.3.694
- McDaniel LS, Benjamin WH, Forman C, Briles DE. Blood clearance by anti-phosphocholine antibodies as a mechanism of protection in experimental pneumococcal bacteremia. *J Immunol*. 1984;133(6):3308-12. DOI: 10.4049/jimmunol.133.6.3308
- Balachandran P, Brooks-Walter A, Virolainen-Julkunen A, Hollingshead SK, Briles DE. Role of pneumococcal surface protein C in nasopharyngeal carriage and pneumonia and its ability to elicit protection against carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2002;70(5):2526-34. DOI: 10.1128/IAI.70.5.2526-2534.2002
- Swiatlo E, King J, Nabors GS, Mathews B, Briles DE. Pneumococcal surface protein A is expressed *in vivo*, and antibodies to PspA are effective for therapy in

- a murine model of pneumococcal sepsis. *Infect Immun.* 2003 Dec;71(12):7149-53. DOI: 10.1128/IAI.71.12.7149-7153.2003
31. Tu AH, Fulgham RL, McCrory MA, Briles DE, Szalai AJ. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1999;67(9):4720-4. DOI: 10.1128/IAI.67.9.4720-4724.1999
 32. Loeffler JM, Djurkovic S, Fischetti VA. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. *Infect Immun.* 2003 Nov;71(11):6199-204. DOI: 10.1128/IAI.71.11.6199-6204.2003
 33. Yuste J, Botto M, Paton JC, Holden DW, Brown JS. Additive inhibition of complement deposition by pneumolysin and PspA facilitates *Streptococcus pneumoniae* septicemia. *J Immunol.* 2005 Aug 1;175(3):1813-9. DOI: 10.4049/jimmunol.175.3.1813
 34. O'Brien DP, Briles DE, Szalai AJ, A Tu H, Sanz I, Nahm MH. Tumor necrosis factor alpha-receptor I is important for survival from *Streptococcus pneumoniae* infections. *Infect. Immun.* 1999;67(2):595-601. DOI: 10.1128/IAI.67.2.595-601.1999
 35. Ogunniyi DA, Folland RL, Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC. Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 2000;68(5):3028-33. DOI: 10.1128/IAI.68.5.3028-3033.2000
 36. Lacy MK, Nicolau DP, Banevicius MA, Nightingale CH, Quintiliani R. Protective effect of trovafloxacin, ciprofloxacin and ampicillin against *Streptococcus pneumoniae* in a murine sepsis model. *J. Antimicrob. Chemother.* 1999;44(4):477-81. DOI: 10.1093/jac/44.4.477
 37. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Мякинина ВП, Красильникова ВМ, Верёвкин ВВ, и др. Эффективность бактериофага Рm3 и ципрофлоксацина при лечении экспериментальной протейной инфекции у мышей. *Бактериология.* 2020;5(1):14-24. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-14-24
 38. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Абаев ИВ. Эффективность бактериофага SA18 при лечении экспериментальной стафилококковой инфекции у мышей линии BALB/c. *Инфекция и иммунитет.* 2017;5:906.
 39. Борзилов АИ, Мякинина ВП, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Красильникова ВМ, Вережкин ВВ, Воложанцев НВ. Оценка лечебно-профилактической эффективности бактериофага *Klebsiella pneumoniae* vB_Krnp_KpV289 на модели острого сепсиса у мышей. *Бактериология.* 2017;2(1):73-77.
 40. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Мякинина ВП, Красильникова ВМ, Верёвкин ВВ, Воложанцев НВ. Сравнительное изучение антибактериальной активности бактериофага PA5 и полимиксина на модели летальной синегнойной инфекции у мышей. *Бактериология.* 2019;2(1):34-43. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-34-43
 41. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Денисенко ЕА, Верёвкин ВВ, Ганина ЕА, Воложанцев НВ. Эффективность фаготерапии экспериментальной эшерихиозной инфекции у мышей. *Бактериология.* 2021;6(2):8-22. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-2-8-22
 42. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Перескокова ЕС, Ганина ЕА. Мышиная модель летального листериоза для оценки эффективности антибактериальных препаратов. *Бактериология.* 2022;7(2):8-21. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-8-21
 43. Sein J, Cachicas V, Becker MI, de Ioannes AE. Mucin allows survival of *Salmonella typhi* within mouse peritoneal macrophages. *Biol Res.* 1993;26:371-380.
 44. Гуськова ТА. Токсикология лекарственных средств. М., 2003; 153 с.
 3. Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16 (6):355-367. DOI: 10.1038/s41579-018-0001-8
 4. Hanquet G, Krizova P, Valentiner-Branth P, Ladhani SN, Nuorti JP, Lepoutre A, et al., Pastore Celentano L, Savulescu C; SplDnet/I-MOVE+ Pneumo Group. Effect of childhood pneumococcal conjugate vaccination on invasive disease in older adults of 10 European countries: implications for adult vaccination. *Thorax.* 2019 May;74(5):473-482. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2018-211767
 5. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec.* 2007 Mar 23;82(12):93-104.
 6. Ganaie F, Saad JS, McGee L, van Tonder AJ, Bentley SD, Lo SW, et al. A New Pneumococcal Capsule Type, 10D, is the 100th Serotype and Has a Large cps Fragment from an Oral *Streptococcus*. *mBio.* 2020 May 19;11(3):e00937-20. DOI: 10.1128/mBio.00937-20
 7. Namkoong H, Ishii M, Funatsu Y, Kimizuka Y, Yagi K, Asami T, et al. Theory and strategy for Pneumococcal vaccines in the elderly. *Hum Vaccin Immunother.* 2016;12(2):336-43. DOI: 10.1080/21645515.2015.1075678
 8. Bogaert D, De Groot, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis.* 2004;4(3):144-154. DOI: 10.1016/S1473-3099(04)00938-7
 9. Faden, H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *Tonawanda/Williamsville pediatrics. J Infect Dis.* 1997;175(6):1440-1445. DOI: 10.1086/516477
 10. Zafar A, Hasan R, Nizamuddin S, Mahmood N, Mukhtar S, Ali F, et al. Antibiotic susceptibility in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pyogenes* in Pakistan: a review of results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2002-15. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(1):103-9. DOI: 10.1093/jac/dkw076
 11. Larsson M, Nguyen HQ, Olson L, Tran TK, Nguyen TV. Multi- drug resistance in *Streptococcus pneumoniae* among children in rural Vietnam more than doubled from 1999 to 2014. *Acta Paediatrica.* 2021;110(6):1916-1923. DOI: 10.1111/apa.157
 12. Chiavolini D, Pozzi G, Ricci S. Animal models of *Streptococcus pneumoniae* disease. *Clin Microbiol Rev.* 2008 Oct;21(4):666-85. DOI: 10.1128/CMR.00012-08
 13. Ramisse F, Binder P, Szatanik M, Alonso JM. Passive and active immunotherapy for experimental pneumococcal pneumonia by polyvalent human immunoglobulin or F(ab')₂ fragments administered intranasally. *J Infect Dis.* 1996;173(5):1123-8. DOI: 10.1093/infdis/168.4.1030
 14. Iannelli F, Chiavolini D, Ricci S, Oggioni MR, Pozzi G. Pneumococcal surface protein C contributes to sepsis caused by *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Infect Immun.* 2004;72(5):3077-80. DOI: 10.1128/IAI.72.5.3077-3080.2004
 15. Grandgirard D, Steiner O, Täuber MG, Leib SL. An infant mouse model of brain damage in pneumococcal meningitis. *Acta Neuropathol.* 2007 Dec;114(6):609-17. DOI: 10.1007/s00401-007-0304-8
 16. Melhus Å, Ryan AF. A mouse model for acute otitis media. *APMIS.* 2003;111(10):989-94. DOI: 10.1034/j.1600-0463.2003.1111012.x
 17. Kadioglu A, Taylor S, Iannelli F, Pozzi G, Mitchell TJ, Andrew PW. Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by deficiency of pneumolysin and by differences in serotype. *Infect. Immun.* 2002;70(6):2886-2890. DOI: 10.1128/IAI.70.6.2886-2890.2002
 18. Iannelli F, Chiavolini D, Ricci S, Oggioni MR, Pozzi G. Pneumococcal surface protein C contributes to sepsis caused by *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Infect. Immun.* 2004;72(5):3077-80. DOI: 10.1128/IAI.72.5.3077-3080.2004
 19. Chiavolini D, Tripodi S, Parigi R, Oggioni MR, Blasi E, Cintonino M, et al. Method for inducing experimental pneumococcal meningitis in outbred mice. *BMC Microbiol.* 2004;4(36). DOI: 10.1186/1471-2180-4-36
 20. Wang E, Ouellet N, Simard M, Fillion I, Bergeron Y, Beauchamp D, Bergeron MG. Pulmonary and systemic host response to *Streptococcus pneumoniae* and

References

1. MR 4.2.0114-16. Laboratory diagnostics of community-acquired pneumonia of pneumococcal etiology. 2017; 64 p. (In Russian).
2. Pneumococcal Conjugate Vaccines in Infants and Children Under 5 Years of Age: WHO position paper – February 2019. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/310968/WER9408.pdf?ua=1>

- Klebsiella pneumoniae* bacteremia in normal and immunosuppressed mice. Infect Immun. 2001;69(9):5294-304. DOI: 10.1128/IAI.69.9.5294-5304.2001
21. Briles DE, Crain MJ, Gray BM, Forman C, Yother J. Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Infect. Immun. 1992;60(1):111-6. DOI: 10.1128/iai.60.1.111-116.1992
 22. Soriano F, Ponte C, Nieto E, Parra A. Correlation of *in vitro* activity and pharmacokinetics parameters with *in vivo* effect of amoxicillin, co-amoxiclav and cefotaxime in a murine model of pneumococcal pneumonia. J Antimicrob Chemother. 1996;38(2):227-36. DOI: 10.1093/jac/38.2.227
 23. Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC, Ades EW, Novak L, Van Ginkel FW, Benjamin WH. Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis. 2003;188(3):339-48. DOI: 10.1086/376571
 24. Azoulay-Dupuis E, Bédos JP, Vallee E, Hardy DJ, Swanson RN, Pocard JJ. Antipneumococcal activity of ciprofloxacin, oxofloxacin and temafloxacin in an experimental mouse pneumonia model at various stages of the disease. J Infect Dis. 1991;163(2):319-24. DOI: 10.1093/infdis/163.2.319
 25. Zwijnenburg PJG, van der Poll T, Florquin S, van Deventer SJH, Roord JJ, van Furth Experimental pneumococcal meningitis in mice: a model of intranasal infection. Infect Dis. 2001;183(7):1143-6. DOI: 10.1086/319271
 26. Bhatt S, Halpin C, Hsu W, Thedinger BA, Levine RA, Tuomanen E, Nadol JBJ. Hearing loss and pneumococcal meningitis: an animal model. Laryngoscope. 1991;101(12Pt1):1285-92. DOI: 10.1002/lary.5541011206
 27. Briles DE, Nahm MH, Schroer K, Davie J, Baker P, Kearney J, Barletta R. Antiphosphocholine antibodies found in normal mouse serum are protective against intravenous infection with type 3 *Streptococcus pneumoniae*. J Exp Med. 1981;153(3):694-705. DOI: 10.1084/jem.153.3.694
 28. McDaniel LS, Benjamin WH, Forman C, Briles DE. Blood clearance by anti-phosphocholine antibodies as a mechanism of protection in experimental pneumococcal bacteremia. J Immunol. 1984;133(6):3308-12. DOI: 10.4049/jimmunol.133.6.3308
 29. Balachandran P, Brooks-Walter A, Virolainen-Julkunen A, Hollingshead SK, Briles DE. Role of pneumococcal surface protein C in nasopharyngeal carriage and pneumonia and its ability to elicit protection against carriage of *Streptococcus pneumoniae*. Immun. 2002;70(5):2526-34. DOI: 10.1128/IAI.70.5.2526-2534.2002
 30. Swiatlo E, King J, Nabors GS, Mathews B, Briles DE. Pneumococcal surface protein A is expressed *in vivo*, and antibodies to PspA are effective for therapy in a murine model of pneumococcal sepsis. Infect Immun. 2003 Dec;71(12):7149-53. DOI: 10.1128/IAI.71.12.7149-7153.2003
 31. Tu AH, Fulgham RL, McCrory MA, Briles DE, Szalai AJ. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 1999;67(9):4720-4. DOI: 10.1128/IAI.67.9.4720-4724.1999
 32. Loeffler JM, Djurkovic S, Fischetti VA. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. Infect Immun. 2003 Nov;71(11):6199-204. DOI: 10.1128/IAI.71.11.6199-6204.2003
 33. Yuste J, Botto M, Paton JC, Holden DW, Brown JS. Additive inhibition of complement deposition by pneumolysin and PspA facilitates *Streptococcus pneumoniae* septicemia. J Immunol. 2005 Aug 1;175(3):1813-9. DOI: 10.4049/jimmunol.175.3.1813
 34. O'Brien DP, Briles DE, Szalai AJ, A Tu H, Sanz I, Nahm MH. Tumor necrosis factor alpha-receptor I is important for survival from *Streptococcus pneumoniae* infections. Infect. Immun. 1999;67(2):595-601. DOI: 10.1128/IAI.67.2.595-601.1999
 35. Ogunniyi DA, Folland RL, Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC. Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 2000;68(5):3028-33. DOI: 10.1128/IAI.68.5.3028-3033.2000
 36. Lacy MK, Nicolau DP, Banevicius MA, Nightingale CH, Quintiliani R. Protective effect of trovafloxacin, ciprofloxacin and ampicillin against *Streptococcus pneumoniae* in a murine sepsis model. J Antimicrob. Chemother. 1999;44(4):477-81. DOI: 10.1093/jac/44.4.477
 37. Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Myakinina VP, Krasilnikova VM, Verevkin VV, et al. Effectiveness of bacteriophage pm3 and ciprofloxacin in treating experimental proteus infections in mice. Bacteriology. 2020;5(1):14-24. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-14-24 (In Russian).
 38. Borzilov AI, Korobova O V, Kombarova TI, Abaev IV. Efficacy of bacteriophage SA18 in the treatment of experimental staphylococcal infection in BALB/c mice. Russian Journal of Infection and Immunity. 2017;5:906. (In Russian).
 39. Borzilov AI, Myakinina VP, Korobova OV, Kombarova TI, Krasilnikova VM, Verevkin VV, Volozhantsev NV. Evaluation of preventive and therapeutic efficacy of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage vB_Kpnp_KpV289 on the model of acute sepsis in mice. Bacteriology. 2017;2(1):73-77. (In Russian).
 40. Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Myakinina VP, Krasilnikova VM, Verevkin VV, Volozhantsev NV. Comparative study of antibacterial activities of bacteriophage PA5 and polymyxin on the model of lethal pseudomonas infection in mice. Bacteriology. 2019;4(1):34-43. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-34-43 (In Russian).
 41. Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Denisenko EA, Verevkin VV, Ganina EA, Volozhantsev NV. Phage therapy efficiency of experimental escherichiosis infection in mice. Bacteriology. 2021;6(2):8-22. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-2-8-22 (In Russian).
 42. Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Pereskokova ES, Ganina EA. A mouse model of lethal listeria for assessing the efficiency of antibacterial drugs. Bacteriology. 2022;7(2):8-21. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-8-21 (In Russian).
 43. Sein J, Cachicas V, Becker MI, de Ioannes AE. Mucin allows survival of *Salmonella typhi* within mouse peritoneal macrophages. Biol Res. 1993;26:371-380.
 44. Guskova TA. Toxicology of medicines. Moscow, 2003; 153 p. (In Russian).
-
- 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 of Rosпотребнадзор
- Tatiana I. Kombarova, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher of the Biological Testing Laboratory, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор
- Evgenia S. Pereskokova, Junior Researcher of the Biological Testing Laboratory, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор
- Elena A. Ganina, Researcher of the Nanobiotechnology Laboratory, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Разработка и оценка качества полужидкой модифицированной среды Раппапорта–Василиадиса (среда MSRV)

А.Ю.Иванова, О.В.Полосенко, М.В.Храмов

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

Во всем мире сальмонеллы относятся к наиболее распространенным бактериальным патогенам. Разработана отечественная модифицированная полужидкая среда Раппапорта–Василиадиса (среда MSRV), предназначенная для обнаружения подвижных видов сальмонелл при проведении санитарно-бактериологических исследований пищевых продуктов и объектов окружающей среды. Проведена специфическая оценка биологических свойств питательной среды на широком наборе тест-штаммов. Установлено, что питательная среда MSRV производства ФБУН ГНЦ ПМБ обладает высокой чувствительностью к подвижным видам *Salmonella* spp., а также имеет высокие ингибирующие свойства в отношении микробов-ассоциантов.

Производство отечественной среды MSRV позволит расширить ассортимент питательных сред для выделения сальмонелл, повысить диагностическую эффективность при санитарно-бактериологических исследованиях пищевых продуктов и объектов окружающей среды и отказаться от закупки дорогостоящих импортных препаратов.

Ключевые слова: *Salmonella* spp., среда MSRV, подвижность, селективность

Для цитирования: Иванова А.Ю., Полосенко О.В., Храмов М.В. Разработка и оценка качества полужидкой модифицированной среды Раппапорта–Василиадиса (среда MSRV). Бактериология. 2023; 8(1): 17–22. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-17-22

Development and quality evaluation of a semi-liquid modified Rappaport–Vasiliadis culture medium (MSRV medium)

A.Yu.Ivanova, O.V.Polosenko, M.V.Khramov

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

Salmonella are the most common bacterial pathogens worldwide. A domestic modified semi-liquid Rappaport–Vasiliadis medium (MSRV medium) has been developed, designed to detect mobile species of *Salmonella* during sanitary and bacteriological studies of food products and environmental objects. A specific assessment of the biological properties of the nutrient medium was carried out on a wide range of test-strains. It has been established that the MSRV nutrient medium produced by the SRCAMB has a high sensitivity to mobile species of *Salmonella* spp., and also has high inhibitory properties against associated microbes.

The production of the domestic MSRV medium will expand the range of nutrient media for the isolation of *Salmonella*, increase the diagnostic efficiency in sanitary and bacteriological studies of food products and environmental objects, and refuse to purchase expensive imported drugs.

Key words: *Salmonella* spp., MSRV medium, mobility, selectivity

For citation: Ivanova A.Yu., Polosenko O.V., Khramov M.V. Development and quality evaluation of a semi-liquid modified Rappaport–Vasiliadis culture medium (MSRV medium). Bacteriology. 2023; 8(1): 17–22. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-17-22

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 область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 31-2170

Статья поступила 01.02.2023, принята к печати 28.04.2023

For correspondence:

Olga V. Polosenko, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher, Microbiological Research Unit, 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) 31-2170

The article was received 01.02.2023, accepted for publication 28.04.2023

Сальмонеллез занимает одно из лидирующих мест среди кишечных инфекций, вызванных бактериями рода *Salmonella* [1].

В настоящее время *Salmonella* spp. в структуре острых кишечных инфекций (ОКИ) занимает 2-е место по распространенности после острых респираторных вирусных инфекций. Сальмонеллез сохраняет свою актуальность при формировании вспышечной заболеваемости и занимает третье место (после ОКИ вирусной этиологии) в структуре очагов групповой заболеваемости с фекально-оральным механизмом передачи инфекции.

По заключению многих экспертов, корм для животных является одним из основных «поставщиков» сальмонеллы в пищевую цепь, поэтому основным источником заболевания человека являются продукты питания из мяса и птицы. Инфицированный человек (особенно бессимптомный носитель) представляет особую опасность в том случае, если он имеет отношение к приготовлению и раздаче пищи, а также продаже пищевых продуктов. Наиболее восприимчивы к заболеванию люди со сниженным иммунным статусом (в том числе грудные дети) и больные, получающие антибиотики [2–4].

Чаще всего возбудителями сальмонеллезом у человека являются серовары *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis*, *S. Dublin* и другие, входящие в серогруппы В, С, D и Е.

По данным Роспотребнадзора [5], несмотря на общую тенденцию к снижению заболеваемости сальмонеллезом, этот показатель в последние годы достоверно не изменился и составил 13,61 на 100 тыс. населения. В январе–августе 2022 г. выявлено 16 360 случаев заболевания сальмонеллезом (11,17 на 100 тыс. населения).

По сведениям референс-центра по мониторингу за сальмонеллезом (ФГУН ЦНИИЭ), в 2021 г., на основании данных опорных баз, на долю трех основных серотипов – *Enteritidis*, *Typhimurium* и *Infantis* – приходилось 97,19% общего числа изолятов сальмонелл, выделенных в учреждениях Роспотребнадзора, и 97,95% изолятов сальмонелл, выделенных от людей [5, 6].

Действующие нормативно-методические документы регламентируют использование различных питательных сред при санитарно-бактериологическом исследовании продуктов питания, кормов, объектов окружающей среды на наличие сальмонелл [7–11].

Перечень отечественных питательных сред для выделения и идентификации сальмонелл обширен и неуклонно расширяется, а выбор конкретных сред во многом определяется исходя из характера исследуемого материала и представления о возможном содержании в нем бактерий рода *Salmonella* [12]. Для этого должны быть выбраны высокочувствительные и специфичные методы, которые одновременно должны быть простыми, быстрыми и недорогими [8].

В число признанных сред, способствующих преимущественному селективному накоплению сальмонелл, наряду с признанным селенитовым бульоном, бульоном Мюллера, входят среды с использованием соли магния в качестве селективного агента: магниевая среда, бульон Раппапорта–Вассилиадиса (RVS-бульон). Основным условием в средах обогащения является эффект накопления сальмонелл при исследовании образцов различной степени биологического загрязнения и ингибирующая способность по отношению к сопутствующей микрофлоре.

В соответствии с новым международным стандартом EN ISO 6579-1 для ускоренного выделения подвижных *Salmonella* spp. предусмотрен горизонтальный метод обнаружения в продуктах питания, кормах, а также образцах окружающей среды, при помощи модифицированной среды Раппапорта–Вассилиадиса (среды MSRV). Принцип выделения сальмонелл основан на миграции подвижных сальмонелл в полужидкой селективной среде, вследствие чего ускоряется процесс выделения *Salmonella* spp. [13, 14]. Для выделения подвижных микроорганизмов рода *Salmonella* питательная среда должна обладать пониженной прочностью геля (полужидкие питательные среды) и высокими ингибирующими свойствами.

В отечественной практике эта питательная среда не производится, поэтому существует необходимость ее разработки в рамках программы импортозамещения, одной из главных задач которой является придание отечественной экономике хороших конкурентоспособных свойств.

Правильный подбор состава питательной среды обеспечит возможность из всего разнообразия микроорганизмов, присутствующих в образце, выделить и получить чистую культуру искомого патогена с целью дальнейшей его идентификации [15].

Цель исследования: провести качественную оценку модифицированной питательной среды Раппапорта–Вассили-

Таблица 1. Рост тест-штаммов на различных белковых основах среды MSRV

Белковая основа	Тест-штаммы				
	<i>S. Enteritidis</i> 11272	<i>S. Typhimurium</i> 79	<i>S. Choleraesuis</i> var. <i>Kunzendorf</i> 309	<i>S. Paratyphi</i> B-8006	<i>S. Typhi</i> H-901
	Разведение 10 ⁻⁶				
ПГРМ	Непрозрачный ореол роста – зона подвижности 4–6 см	Непрозрачный ореол роста – зона подвижности 2,5–3,5 см	Непрозрачный ореол роста – зона подвижности 3,0–5,0 см	Непрозрачный ореол роста – зона подвижности 0,5–1,5 см	Рост отсутствует
СГК	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует
ГКНСР	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует
Контроль	Непрозрачный ореол роста – зона подвижности 3–5 см	Непрозрачный ореол роста – зона подвижности 2,0–3,0 см	Непрозрачный ореол роста – зона подвижности 2,0–3,0 см	Непрозрачный ореол роста – зона подвижности 0,5–1,5 см	Рост отсутствует
ГРМ-агар, контроль посевной дозы	88 колоний типичной морфологии	76 колоний типичной морфологии	79 колоний типичной морфологии	81 колония типичной морфологии	80 колоний типичной морфологии

Таблица 2. Состав модифицированной питательной среды Раппапорта–Василиадиса с внесением новобицина

Состав, г/л	Вариант 1	Вариант 2	Вариант 3	Вариант 4	Контроль
ПГРМ	3,0	3,0	3,0	4,0	RVS-бульон
Пептон мясной	2,0	2,0	-	-	
Пептон ферментативный	-	-	2,0	-	
Соевый пептон	1,0	0,5	1,0	1,0	
Хлорид натрия	8,0	8,0	8,0	8,0	
Дигидрофосфат калия	1,6	1,6	1,6	1,6	
Хлорид магния	13,0	13,0	13,0	13,0	
Малахитовый зеленый	0,04	0,04	0,04	0,04	
Агар	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Новобиоцин	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015

адиса для выделения подвижных бактерий рода *Salmonella*, разработанной на основе отечественных белковых компонентов.

Материалы и методы

Питательные среды. Использовались питательные среды производства ФБУН ГНЦ ПМБ: питательный агар для культивирования микроорганизмов: ГРМ-агар РУ № ФСР 2007/00001; питательный бульон для накопления сальмонелл по Раппапорту–Василиадису сухой (RVS-бульон) РУ № ФСР 2010/09163, экспериментальная полужидкая модифицированная среда Раппапорта–Василиадиса (среда MSRV). В качестве контрольной использовали среду лабораторного приготовления (RVS-бульон с внесением агара 2,5 г/л) [13]. В полужидкие MSRV вносили селективную добавку – новобиоцин производства AppliChem.

Тест-штаммы. В работе использованы тест-штаммы микроорганизмов из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск».

Использовали рабочие разведения 10^{-6} для целевых культур тест-штаммов: *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* 11272, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* 79, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Choleraesuis* var. *Kunzendorf*

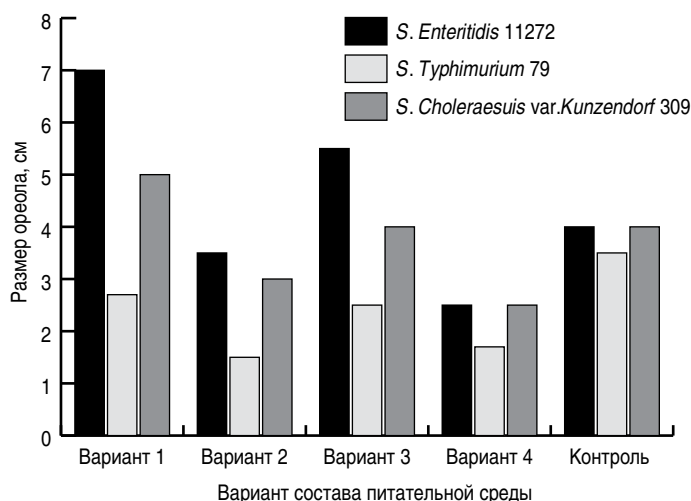


Рис. 1. Ростовые характеристики сальмонелл на питательных средах. Размер ореола роста – зоны подвижности сальмонелл (в см) в зависимости от состава среды.

309, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhi* H-901, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Paratyphi* B-8006, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Gallinarum* 665.

Для оценки ингибирующих свойств испытуемой среды использовали нецелевые тест-штаммы *Escherichia coli* 3912/41 (O55:K59), *E. coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 NCTC 775, *Staphylococcus aureus* FDA 209-P ATCC 6538-P, *Proteus mirabilis* 46, *Shigella sonnei* «S form», *Proteus vulgaris* HX 19 222, *Citrobacter freundii* 9750 NCTC 101/57, *Pseudomonas aeruginosa* 27/99 из разведений 10^{-4} .

Методика посева. В центр чашек Петри со средой MSRV наносили по 0,1 мл микробной взвеси каждого тест-штамма из соответствующих разведений. Через 18–24 ч инкубации посевов при температуре $41,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$ визуально учитывали наличие и характер роста.

Ростовые свойства питательных сред оценивали методом, регламентированным МУК 4.2.2316 – 08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» [10].

Результаты и обсуждение

В качестве основных белковых компонентов для питательных сред широко используются ферментативные гидролизаты рыбы, рыбной муки, мяса, казеина и т.д., имеющие

Таблица 3. Биологические показатели среды MSRV на минимальном наборе тест-штаммов после внесения селективной добавки

Тест-штаммы	Вариант 1	Вариант 2	Вариант 3	Вариант 4	Контроль	ГРМ-агар
Непрозрачный ореол роста – зона подвижности, см						
<i>S. Enteritidis</i> 11272, разведение 10^{-6}	6–7	3–4	5–6	2,5–3	4–5	76 кол. типичной морфологии
<i>S. Typhimurium</i> 79, разведение 10^{-6}	2,5–3	1,5–2	2–3	1,5–2	3–4	80 кол. типичной морфологии
<i>S. Choleraesuis</i> var. <i>Kunzendorf</i> 309, разведение 10^{-6}	5–5,5	3–3,5	3,5–4	2,5–3	4–4,5	71 кол. типичной морфологии
<i>E. coli</i> 3912/41 (O55:K59), разведение 10^{-4}	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Сливной рост
<i>C. freundii</i> 9750 NCTC 101/57, разведение 10^{-4}	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Сливной рост

Таблица 4. Биологический контроль питательной среды MSR/V на широком наборе тест-штаммов

Тест-штаммы	Разведение	Биологические показатели	ГРМ-агар
<i>S. Enteritidis</i> 11272	10 ⁶	Непрозрачный ореол роста – зона подвижности 6–7 см	81 кол. типичной морфологии
<i>S. Typhimurium</i> 79	10 ⁶	Непрозрачный ореол роста – зона подвижности 2,5–3 см	79 кол. типичной морфологии
<i>S. Choleraesuis</i> var. <i>Kunzendorf</i> 309	10 ⁶	Непрозрачный ореол роста – зона подвижности 5–5,5 см	78 кол. типичной морфологии
<i>S. Paratyphi</i> B-8006	10 ⁶	Непрозрачный ореол роста – незначительная зона подвижности 0,5–1,5 см	69 кол. типичной морфологии
<i>E. coli</i> 3912/41 (O55:K59)	10 ⁴	Рост отсутствует	Сливной рост
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10 ⁴	Рост отсутствует	Сливной рост
<i>S. aureus</i> FDA 209-P ATCC 6538-P	10 ⁴	Рост отсутствует	Сливной рост
<i>P. vulgaris</i> HX 19 222	10 ⁴	Рост отсутствует	Сливной рост
<i>S. sonnei</i> «S form»	10 ⁴	Рост отсутствует	Сливной рост
<i>C. freundii</i> 9750 NCTC 101/57	10 ⁴	Рост отсутствует	Сливной рост
<i>P. aeruginosa</i> 27/99	10 ⁴	Рост отсутствует	Сливной рост
<i>P. mirabilis</i> 46	10 ⁴	Рост отсутствует	Сливной рост
<i>E. faecalis</i> 775	10 ⁴	Рост отсутствует	Сливной рост

высокую степень расщепления белка и полный набор незаменимых аминокислот, обеспечивающие питательную потребность достаточно широкого круга микроорганизмов в азотистом питании [16, 17].

При конструировании полужидкой модифицированной питательной среды Раппапорта–Вассиладиса на первом этапе проводили выбор белковой основы. Для этого были использованы: панкреатический гидролизат рыбной муки (ПГРМ), гидролизат казеина неглубокой степени расщепления (ГКНСП) и солянокислотный гидролизат казеина (СГК), г/л: ПГРМ/ГКНСП/СГК – 3,0; пептон мясной – 2,0; пептон соевый – 1,0; хлорид натрия – 8,0; дигидрофосфат калия – 1,6; хлорид магния – 13,0; малахитовый зеленый – 0,04; агар бактериологический – 2,5; новобиоцин – 0,015.

Биологические показатели вариантов среды MSR/V на различных белковых основах с использованием тест-штаммов *S. Enteritidis* 11272, *S. Typhimurium* 79, *S. Choleraesuis* var. *Kunzendorf* 309, *S. Paratyphi* B-8006, *S. Typhi* H-901 представлены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что самым приемлемым оказался вариант среды MSR/V на основе ПГРМ, который обеспечил рост тест-штаммов *S. Enteritidis* 11272, *S. Typhimurium* 79, *S. Choleraesuis* var. *Kunzendorf* 309, *S. Paratyphi* B-8006 в виде непрозрачных ореолов с зонами подвижности (за исключением *S. Typhi* H-901).

В инструкциях зарубежных производителей, в ГОСТ 31659-2012 имеются сведения о том, что на среде Раппапорта–Вассиладиса отсутствует рост *S. Typhi*, аналогично результатам, полученным на разработанной среде [7, 18].

На среде с использованием таких основ, как ГКНСП и СГК, рост штаммов всех сальмонелл отсутствовал.

Дальнейшая оптимизация состава среды MSR/V была проведена по количественному содержанию ПГРМ и пептонов, а также обработке концентрации селективной добавки. Концентрации остальных компонентов оптимальные и не изменялись (табл. 2).

Биологические показатели всех вариантов среды MSR/V после внесения селективной добавки представлены в табл. 3.

Из табл. 3 видно, что размер ореола подвижности сальмонелл зависит от количественного содержания соевого пептона и ПГРМ.

На рис. 1 наглядно представлены рост и размер ореола подвижности сальмонелл в зависимости от состава среды MSR/V. На рис. 2–4 представлен рост сальмонелл в зависимости от состава среды MSR/V.

Таким образом, отработан предварительный состав модифицированной питательной среды Раппапорта–Вассиладиса, г/л: ПГРМ – 3,0; пептон мясной – 2,0; пептон соевый – 1,0; дигидрофосфат калия – 1,6; хлорид магния – 13,0; хлорид натрия – 8,0; малахитовый зеленый – 0,04; натрий углекислый – 0,3 ± 0,2, агар бактериологический – 2,4 ± 0,2. Состав селективной добавки: новобиоцин – 0,015.

Биологический контроль питательной среды MSR/V на широком наборе тест-штаммов представлен в табл. 4.

Таким образом, при изучении культуральных свойств питательной среды MSR/V на широком наборе тест-штаммов микроорганизмов было отмечено, что среда обладает высокой чувствительностью при посеве подвижных сальмонелл, селективностью по отношению к грамположительным и большинству грамотрицательных бактерий.

В соответствии с EN ISO 6579-1:2017 после обнаружения предполагаемого диффузного роста сальмонелл со среды MSR/V с края подвижной зоны отбирают материал для пересева на дифференциально-диагностические среды [13]. В результате пересева всех тест-штаммов сальмонелл со среды MSR/V на XLD-агар были получены колонии типичной для сальмонелл морфологии: круглые, прозрачные, бесцветные с черным центром, диаметром 1,0–3,0 мм.

Биологические показатели разработанной модифицированной полужидкой среды Раппапорта–Вассиладиса (среда MSR/V):

- специфическая активность: среда MSR/V обеспечивает при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10⁶ через 18–24 ч инкубации при температуре 41,5 ± 1,5°C на всех засеянных чашках Петри рост каждого тест-штамма *S. Enteritidis* 11272, *S. Typhimurium* 79 и *S. Choleraesuis* var. *Kunzendorf* 309 с образованием ореола просветления среды – зоны подвижности не менее 3,0 см;

- ингибирующие свойства: среда MSR/V подавляет рост *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* 27/99, *C. freundii* 101/57, *E. faecalis* 775 при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из

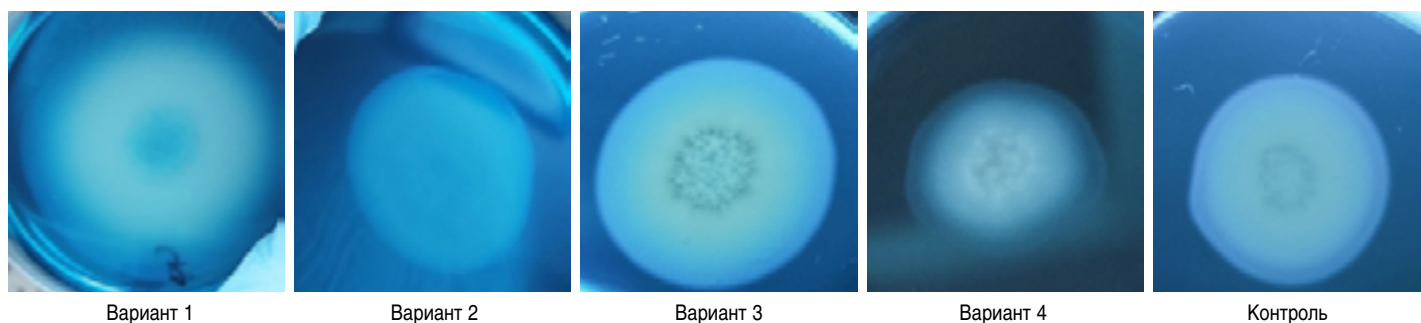


Рис. 2. Рост тест-штамма *S. Enteritidis* 11272 на среде MSRВ.

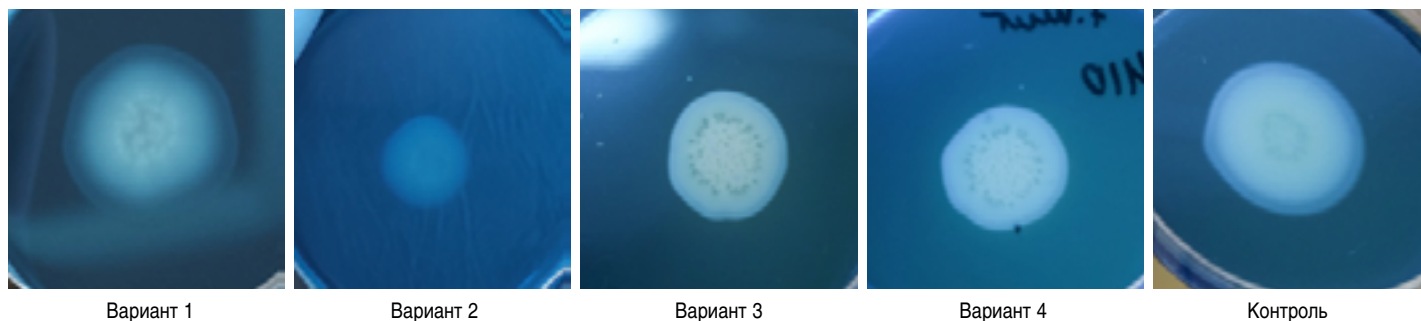


Рис. 3. Рост тест-штамма *S. Typhimurium* 79 на среде MSRВ.

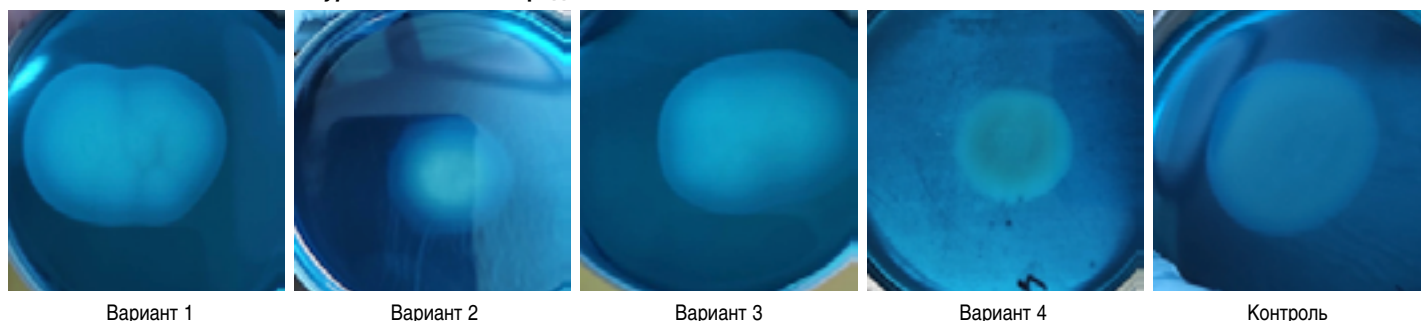


Рис. 4. Рост тест-штамма *S. Choleraesuis* var. *Kunzendorf* 309 на среде MSRВ.

разведения 10^{-4} через 18–24 ч инкубации при температуре $41,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$ на всех засеянных чашках Петри.

В процессе конструирования питательной среды MSRВ были также исследованы методы стерилизации. В состав питательной среды входит агар бактериологический в количестве $2,4 \pm 0,2$ г/л. При автоклавировании питательной среды происходит деструкция агара, а это, в свою очередь, приводит к потере прочности среды и ее разжижению. На основании исследований определен метод стерилизации высокоселективной среды MSRВ – кипячением в течение 1–2 мин. Способ стерилизации питательных сред кипячением доступен любой бактериологической лаборатории, занимающейся приготовлением питательных сред.

Заключение

Разработанная питательная среда MSRВ ФБУН ГНЦ ПМБ на основе отечественной белковой основы обладает высокой чувствительностью в отношении подвижных бактерий *Salmonella* spp. Ингибирующие свойства питательной среды в отношении грамположительных бактерий достигаются за счет внесения селективных добавок, таких как малахитовый зеленый, магния хлорид, новобиоцин, и температурой инкубирования $41,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Производство высокочувствительной отечественной питательной среды MSRВ позволит расширить ассортимент питательных сред для выделения сальмонелл, повысить диагностическую эффективность при санитарно-бактериологических исследованиях и отказаться от закупки дорогостоящих импортных препаратов.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

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

Конфликт интересов

Авторы заявляет 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. Тепеева АР. Сальмонеллез: патогенез, клинико-эпидемиологическая специфика, терапия. Цифровая наука. 2021;5:42-47.

2. Воробьев АВ, Быков АС, Пашков ЕП, Рыбакова АМ. Микробиология. М.: Медицина; 2003, 336 с.
3. Кремлева АА, Скоморова ЮА. Анализ чувствительности к антибиотикам бактерий рода *Salmonella*, выделенных из кормов для животных. Сборник научных трудов СКНИИЖ. 2021;10(1):42-26.
4. СанПин 3.3686-21. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней. Утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 28-01-2021.
5. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2021 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2022. 340 с.
6. Литусов НВ, Козлов АП. Сальмонеллы. Иллюстрированное учебно-методическое пособие. Екатеринбург: УГМА; 2012, 51 с.
7. ГОСТ ISO 11133-2016. Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред. Введ. 2017-07-01. М.: Стандартинформ, 2016, 95 с.
8. ГОСТ 31659-2012 (ISO 6579:2002). Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*. Введ. 2013-07-01. М.: Стандартинформ, 2014, 20 с.
9. МУ 4.2.2723-10. Лабораторная диагностика сальмонеллез, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды. Введ. 2010-09-02 Федеральный центр гигиены и эпиднадзора Роспотребнадзора; 2011, 111 с.
10. МУК 4.2.2316-08. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания. Введ. 2008-01-18. М.: Федеральный центр гигиены и эпиднадзора Роспотребнадзора, 2008, 67 с.
11. Технический регламент Таможенного союза. О безопасности пищевой продукции: ТР ТС 021/2011. Введ. 2013-07-01. М.: РосТест, 2013. 242 с.
12. Шепелин АП, Полосенко ОВ, Марчихина ИИ, Шолохова ЛП, Ажармачева 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
13. ISO 6579-1:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
14. Блинова АЛ, Макаренко ДВ. Применение экспресс-методов микробиологических испытаний молочной продукции для оценки ее соответствия требованиям технических регламентов. Научные труды Дальрыбвтуз. 2019;47(1):18-24.
15. Шепелин АП. Сравнительная оценка качества основных средств отечественного и импортного производства. Астраханский медицинский журнал. 2013;8(1):321-6.
16. Артюхин ВИ, Шепелин АП, Киселева НВ. Белковые гидролизаты в производстве питательных сред. Производство и применение продуктов микробиологических производств. Обзорн. информ. Вып. 9-10. М., 1990, 52 с.
17. Шепелин АП. Современное состояние и тенденции в разработке, производстве и применении питательных сред. Бактериология. 2016;(1):42-7. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-42-47
18. ReadyTube® Modified Semi-Solid RAPPAPORT-VASSILIADIS Medium. [электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.sigmaaldrich.com/RU/en/product/mm/146622> (Дата обращения 14.03.2023).
3. Kremleva AA, Skomorina YuA. Analysis of antibiotic susceptibility of bacteria of the genus *Salmonella* isolated from animal feed. Collection of Scientific Papers of KRCAHVM. 2021;10(1):42-26. (In Russian).
4. SanPIN 3.3686-21. Sanitary and epidemiological requirements for the prevention of infectious diseases. Approved. Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation 28-01-2021. (In Russian).
5. On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2021: State Report. Moscow: Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-being, 2022, 340 p. (In Russian).
6. Litusov NV, Kozlov AP. *Salmonella*. Yekaterinburg, 2012, 51 p. (In Russian).
7. GOST ISO 11133-2016. Microbiology of food, animal feed and water. Preparation, production, storage and determination of working characteristics of nutrient media. Introduction. 2017-07-01. Moscow: "Standartinform" Publ., 2016, 95 p. (In Russian).
8. GOST 31659-2012 (ISO 6579:2002). Food products. A method for detecting bacteria of the genus *Salmonella*. Introduction. 2013-07-01. Moscow: Standartinform, 2014, 20 p. (In Russian).
9. MU 4.2.2723-10. Laboratory diagnostics of salmonellosis, detection of salmonella in food and environmental objects. Introduction. 2010-09-02 Federal Center for Hygiene and Surveillance of Rospotrebnadzor; 2011, 111 p. (In Russian).
10. МУК 4.2.2316-08 Methods of control. Biological and microbiological factors. Methods of control of bacteriological nutrient media. Methodical instructions. Introduction. 2008-01-18. – Moscow: Federal Center for Hygiene and Surveillance of Rospotrebnadzor, 2008, 67 p. (In Russian).
11. Technical Regulations of the Customs Union. About food safety: TR CU 021/2011. Introduction. 2013-07-01. Moscow: RosTest, 2013, 242 p. (In Russian).
12. 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).
13. ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 1: Detection of *Salmonella* spp. (In Russian).
14. Blinova AL, Makarenko DV. Application of express methods of microbiological tests of dairy products to assess the conformity of technical regulations. Scientific Journal of the Far East State Technical Fisheries University. 2019;47(1):18-24. (In Russian).
15. Shepelin AP. The comparative estimation of quality of main nutritive means of domestic and imported production. Astrakhan Medical Journal. 2013;8(1):321-6. (In Russian).
16. Artyukhin VI, Shepelin AP, Kiseleva NV. Protein hydrolysates in the production of nutrient media. Production and application of microbiological production products. Overview. inform. Vol. 9-10. Moscow, 1990, 52 p. (In Russian).
17. Shepelin AP. Nutrient media: current status and trends in design, production and application. Bacteriology. 2016;(1):42-7. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-42-47 (In Russian).
18. ReadyTube® Modified Semi-Solid RAPPAPORT-VASSILIADIS Medium. Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/RU/en/product/mm/146622>. (Accessed 14.03.2023). (In Russian).

Информация о соавторах:

Иванова Анастасия Юрьевна, младший научный сотрудник сектора микробиологических исследований ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Храмов Михаил Владимирович, кандидат медицинских наук, заместитель директора по качеству и развитию ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Anastasia Yu. Ivanova, junior Researcher of Microbiological Research Sector, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Mikhail V. Khramov, MD, PhD, Deputy Director for Quality and Development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

References

1. Teppeeve AR. Salmonellosis: pathogenesis, clinical and epidemiological specifics, therapy. Tsifrovaya nauka. 2021;5:42-47. (In Russian).
2. Vorobev AV, Bykov AS, Pashkov EP, Rybakova AM. Mikrobiologiya. Moscow: "Meditsina" Publ.; 2003, 336 p. (In Russian).

Вариант сибирезвенового вакцинного штамма СТИ-1 с гемолитической и лецитиназной активностями

Л.И.Маринин, Н.А.Шишкова, Е.А.Тюрин, А.Н.Мокриевич, И.А.Дятлов

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

Проблема специфической профилактики сибирской язвы является чрезвычайно актуальной. Существующие живые и химические вакцины не создают иммунитета против некоторых штаммов *Bacillus anthracis*, циркулирующих в природе и выделенных от людей. В связи с этим задача совершенствования противосибирезвеновых вакцин остается актуальной для медицинской и ветеринарной практики, ведется постоянный поиск новых средств специфической профилактики сибирской язвы. В качестве одного из путей создания сибирезвеновых вакцин является введение в вакцинные штаммы дополнительных генетических детерминант, повышающих иммуногенность. С этой целью в клетки вакцинного штамма СТИ-1 проклонировали оперон *Bacillus cereus* (штамм ВКМ-В164), обеспечивающий гемолитическую и лецитиназную активности этого микроорганизма за счет синтеза секретируемых ферментов – сфингомиелиназы (Sph) и фосфолипазы C (plc). Был получен вариант вакцинного штамма СТИ-1рОВ12, обладающий высокой иммуногенностью, гемолитической и лецитиназной активностями, способный расти на среде с эритромицином. Вариант может быть использован для профилактики при заражении «вакцинорезистентными» штаммами возбудителя сибирской язвы.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, сибирская язва, вакцины, профилактика, штаммы

Для цитирования: Маринин Л.И., Шишкова Н.А., Тюрин Е.А., Мокриевич А.Н., Дятлов И.А. Вариант сибирезвенового вакцинного штамма СТИ-1 с гемолитической и лецитиназной активностями. Бактериология. 2023; 8(1): 23–29. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-23-29

A variant of the vaccine strain *Bacillus anthracis* STI-1 with hemolytic and lecithinase activities

L.I.Marinin, N.A.Shishkova, E.A.Tyurin, A.N.Mokrievich, I.A.Dyatlov

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

The problem of specific prophylaxis of anthrax is extremely urgent. Existing live and chemical vaccines do not provide immunity against some strains of *Bacillus anthracis* circulating in nature and isolated from humans. In this regard, the task of improving anthrax vaccines remains relevant for medical and veterinary practice, and there is a constant search for new means of specific prophylaxis of anthrax. One of the ways to create anthrax vaccines is to introduce additional genetic determinants that increase immunogenicity into vaccine strains. For this purpose, the *Bacillus cereus* operon (strain VKM-B164), was cloned into the cells of the vaccine strain STI-1. As a result, the microorganism has acquired hemolytic and lecithinase activities due to the synthesis of secreted enzymes – sphingomyelinase (Sph) and phospholipase C (plc). A variant of the vaccine strain STI-1рОВ12 was obtained, which has high immunogenicity, hemolytic and lecithinase activities. Also the strain was capable to grow on a medium with erythromycin. The variant can be used for prophylaxis in case of infection with «vaccine-resistant» strains of the anthrax pathogen.

Key words: *Bacillus anthracis*, anthrax, vaccines, prevention, strains

For citation: Marinin L.I., Shishkova N.A., Tyurin E.A., Mokrievich A.N., Dyatlov I.A. A variant of the vaccine strain *Bacillus anthracis* STI-1 with hemolytic and lecithinase activities. Bacteriology. 2023; 8(1): 23–29. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-23-29

Для корреспонденции:

Маринин Леонид Иванович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций 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) 36-0003

Статья поступила 22.03.2023, принята к печати 28.04.2023

For correspondence:

Leonid I. Marinin, MD, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Anthrax Microbiology, Department of Particularly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpuikhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

The article was received 22.03.2023, accepted for publication 28.04.2023

Несмотря на статистическое снижение заболеваемости, ежегодно практически во всех странах мира среди животных и людей регистрируются случаи сибирской язвы, в том числе со смертельными исходами, что позволяет считать ее по-прежнему опасной инфекцией. Для профилактики сибирской язвы в России более 60 лет используется вакцина на основе живой аттенуированной культуры *Bacillus anthracis* бескапсульного штамма СТИ-1. Многолетние наблюдения показали стабильность основных свойств вакцинного штамма СТИ-1. Однако в настоящее время требования к вакцине возросли, и она перестала удовлетворять нужды эпидемиологов. В частности, появились сведения о недостаточной эффективности существующей живой вакцины СТИ. По данным эпидемиологического опыта, коэффициент эпидемиологической эффективности однократной скарификационной прививки людей вакциной СТИ составил 36,7% [1, 2]. Даже двукратная скарификационная вакцинация создает иммунитет через 20–30 дней лишь у 70% привитых людей, и были зарегистрированы случаи сибирской язвы среди таких контингентов [3–6]. Недостаточная эффективность вакцины СТИ связана с длительным латентным периодом и периодом нарастания (до 3–4 нед.) а также относительно коротким периодом высокой специфической резистентности, что проявляется «пробоем» иммунитета в первые 5–14 суток и через 3 мес. после иммунизации. Указанные недостатки обусловлены тем, что формирование поствакцинального иммунитета после введения живой вакцины связано с колонизацией, размножением и последующей диссеминацией по лимфатическим путям клеток вакцинного штамма. Наряду с этим живая вакцина обеспечивает формирование специфического иммунитета, воздействующего в первую очередь на начальные этапы инфекции (антибактериальный иммунитет), и в случае генерализации процесса недостаточно эффективно предотвращает токсические эффекты, наблюдаемые на заключительной стадии заболевания [7, 8].

Кроме этого, в последние годы из-за активной миграции и интенсификации сельского хозяйства возрос риск встречи с высоковирулентными природными штаммами, против которых защита существующей вакцины неэффективна. Существующие живые и химические вакцины не создают иммунитета против некоторых штаммов *B. anthracis*, циркулирующих в природе и выделенных от людей [9–16]. Установлено, что вакцины на основе штаммов СТИ-1, №55 ВНИИВВиМ, 228/8, 34F2 Sterne и 1190-R не создавали иммунитета против 9 вирулентных штаммов. Подобные вирулентные штаммы получили название «вакцинорезистентных».

С учетом этого задача совершенствования противосибиреязвенных вакцин остается актуальной для медицинской и ветеринарной практики, ведется постоянный поиск новых средств специфической профилактики сибирской язвы [17–23].

Нужны новые подходы к поиску более эффективных вакцинных штаммов, к которым можно отнести создание штаммов с дополнительными антигенными детерминантами, не свойственными традиционным штаммам.

Идеальная вакцина должна быть безопасной, высокоэффективной и при однократном введении обеспечивать пожизненный иммунитет у 100% привитых [24]. Однако таких вакцин пока не существует.

Анализ публикаций на тему противосибиреязвенных препаратов показывает, что постоянно ведутся работы по созданию новых высокоэффективных и безопасных вакцин против сибирской язвы.

В качестве одного из путей создания сибиреязвенных вакцин является введение в вакцинные штаммы дополнительных генетических детерминант, повышающих иммуногенность. Значительный интерес представляет сообщение Цыганковой О.И. с сотр. [25–27] о неоднородности клеточного состава вакцинного штамма СТИ-1 по содержанию вариантов с различной гемолитической и лецитиназной активностями. При исследовании гемолитической активности вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 было выявлено два варианта особенностей морфологии колоний:

- вариант I: крупные (3–5 мм), плоские, матовые, шероховатые колонии с крупными сглаженными завитками на поверхности и пологим краем, не лизируют эритроциты барана;
- вариант II: мелкие (до 2,5 мм), выпуклые, блестящие, с четким краем колонии с мелкими крутыми завитками на поверхности, с широкой зоной лизиса (2–8 мм) через 18–24 ч выращивания на среде с эритроцитами барана [27].

В экспериментах на морских свинках была изучена иммунологическая эффективность исходной вакцины и полученных вариантов. Индекс иммунитета у животных, иммунизированных спорами культуры варианта II, был на порядок выше, чем у животных, иммунизированных спорами варианта I [27].

Цель работы: получение варианта сибиреязвенного вакцинного штамма СТИ-1, обладающего гемолитической и лецитиназной активностями и высокой эффективностью.

Материалы и методы

Оперон *B. cereus* проклонировали в клетки вакцинного штамма СТИ-1 по ранее разработанной методике [28].

В работе использовали штаммы *B. anthracis* Ч-7, 81/1, 3-706, СТИ-1 и 71/12 (второй вакцины Ценковского), №55 ВНИИВВиМ, *B. cereus* ВКМ-В164 из музейной коллекции «ГКПМ-Оболensk».

Биологические, биохимические свойства штаммов СТИ-1рОВ12 в сравнении с исходным штаммом СТИ-1 определяли по существующим методикам [29].

Остаточную вирулентность определяли на беспородных белых мышах.

Безвредность штамма СТИ-1рОВ12 определяли на морских свинках [30].

С целью изучения патоморфологических и гистологических изменений, вызываемых у морских свинок введением 50×10^6 спор штамма СТИ-1рОВ12, животных умерщвляли на 1, 3, 8, 15 и 30-е сутки [30].

С целью определения иммунной перестройки организма использовали кожно-аллергическую пробу с антраксином, которую выполняли по существующей методике на морских свинках через 10 и 20 дней после подкожного введения спорных культур вакцинных штаммов в дозах по 50×10^6 спор [29].

Сероконверсию у иммунизированных кроликов определяли по уровню превентивных свойств сыворотки (ПСС) [29].

Иммунологическую эффективность штаммов СТИ-1рОВ12 и СТИ-1 оценивали по устойчивости вакцинированных морских свинок, золотистых хомячков и кроликов к заражению разными дозами вирулентной культуры возбудителя сибирской язвы. По результатам рассчитывали показатели LD₅₀ и иммунный индекс [29–31].

Результаты и обсуждение

В клетки вакцинного штамма СТИ-1 проклонировали оперон *B. cereus* (штамм ВКМ-В164), обеспечивающий гемолитическую и лецитиназную активности этого микроорганизма за счет синтеза секретируемых ферментов – сфингомиелиназы (Sph) и фосфолипазы С (plc) [32, 33]. Фосфолипазы С обычно являются экзогенными бактериальными ферментами. Известно, что некоторые из бактериальных фосфолипаз являются гемолизинами [33].

Рекомбинантную плазмиду рОВ12, несущую гены Sph и plc, ввели в клетки СТИ-1 методом электропорации. Интеграцию плазмиды с геномом микробной клетки осуществили путем пассирования полученных эритромицинрезистентных клонов в непермиссивных для репликона рЕ194 условиях. При этом показали, что плаزمида рОВ12 в составе генома СТИ-1 находится в автономном состоянии. Полученный вариант СТИ-1рОВ12 (СТИ-5 или ПМС-5) в отличие от исходного штамма приобрел гемолитическую и лецитиназную активности.

На рис. 1 представлены результаты высева единичных колоний штамма СТИ-1рОВ12 на питательные среды, содержащие кровь или лецитин.

Следует отметить, что зона гемолиза наблюдается у каждой колонии, то есть культура однородна по признаку гемолитической активности. Такая же картина наблюдается при высеве штамма на среду с лецитином.

Результаты выделения и исследования белков штамма СТИ-1рОВ12 показали, что лецитиназной активностью обладали фракции, содержащие белок с молекулярной массой 35 кДа, в то время как лецитиназной и гемолитической активностями обладали фракции, где наряду с указанным белком находились минорные белки с молекулярными массами 28 и 29 кДа.

По культурально-морфологическим свойствам штамм СТИ-1, наследующий плазмиду рОВ12, не отличался от исходного штамма. В окрашенных по Граму мазках наблюдали грамположительные палочки с обрубленными концами, оди-

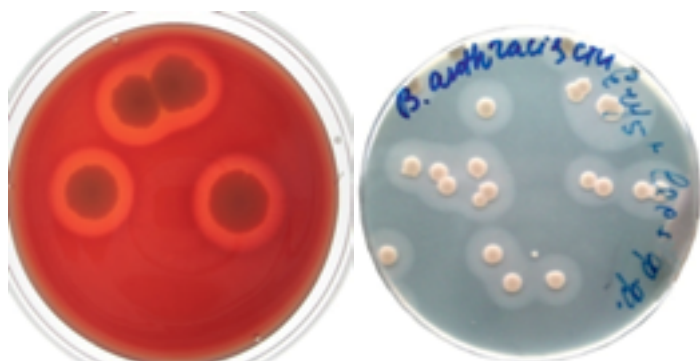


Рис. 1. Гемолитическая и лецитиназная активности штамма СТИ-1рОВ12.

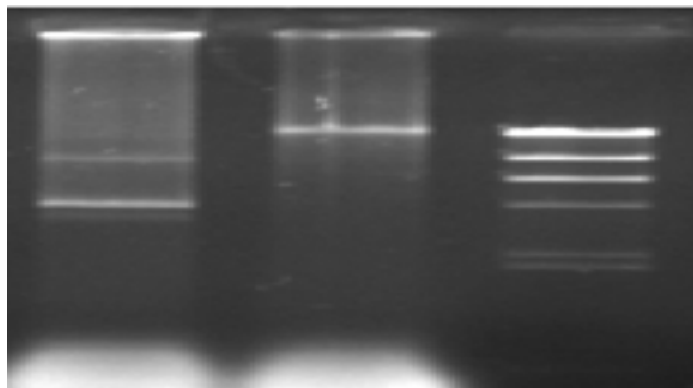


Рис. 2. Элетрофореграмма ДНК из штаммов СТИ-1рОВ12 и СТИ 1. 1 – ДНК штамма СТИ-1рОВ12. 2 – ДНК штамма СТИ-1. 3 – ДНК фага λ/HindIII.

ночные, парные, собранные в цепочки. На плотной питательной среде из триптического гидролизата рыбной муки вырастали плоские шероховатые матовые колонии R-формы с неровными краями. Через 6 суток выращивания на плотной питательной среде в 80–90% клеток образовывались центрально расположенные овоидные споры, окрашивающиеся по Цилю–Нильсену в розовый цвет. В жидкой питательной среде рост в виде «комка ваты» на дне сосуда, без помутнения среды и пленки. В организме и на специальных питательных средах капсулы не образуются.

Отличительными признаками штамма СТИ-1рОВ12 являются резистентность к эритромицину, наличие гемолитической и лецитиназной активностей, а также пониженная скорость спорообразования.

С целью изучения стабильности наследования плазмиды рОВ12 была выделена ДНК. Результаты исследования ДНК представлены на рис. 2.

На представленной элетрофореграмме видно, что штамм СТИ-1рОВ12 содержит в автономном состоянии плазмиду рОВ12 размером около 4000 п.о.

Штамм СТИ-1рОВ12 при проверке полноценности и стабильности детерминант капсулообразования (cap) и токсинообразования (pag, lef, суа) методом полимеразной цепной реакции не отличался от исходного штамма СТИ-1.

Оценку безвредности и иммуногенности штамма СТИ-1рОВ12 провели в сравнении с вакцинным штаммом СТИ-1 по показателю вирулентности и вызываемым патоморфологическим изменениям у животных.

Исследования показали, что остаточная вирулентность полученного штамма оказалась одинаковой с исходным штаммом СТИ-1: величины LD₅₀ составили $6,8 \times 10^5$ ($4,3 \times 10^4 - 8,2 \times 10^6$) и $1,2 \times 10^5$ ($3,8 \times 10^4 - 7,8 \times 10^6$) спор соответственно.

Безвредность штамма СТИ-1рОВ12 определили на морских свинках, которым под кожу бедра ввели по 50×10^5 спор в объеме 0,5 см³. За животными наблюдали в течение 30 сут. Клинические проявления на подкожное введение микробных клеток характеризовались развитием геморрагических отеков в паховой области (в месте введения спор) у 25–32% животных. До 30% морских свинок погибало через 4–9 суток после аппликации культуры.

С целью изучения патоморфологических и гистологических изменений, вызываемых у морских свинок введением

50 × 10⁶ спор штамма СТИ-1рОВ12, животных умерщвляли на 1, 3, 8, 15 и 30-е сутки.

Патоморфологические исследования показали, что в ответ на введение животным споровой культуры аттенуированного штамма СТИ-1рОВ12 в организме развивались типичные для вакцинального процесса проявления, носившие обратимый характер. Следует отметить, что наблюдаемые нами изменения в организме практически не отличались от описанных ранее в ответ на введение вакцинного штамма СТИ-1 [34].

Основным показателем аттенуированных штаммов, перспективных в качестве вакцинных, является их иммуногенность. Иммунологическую эффективность полученного штамма СТИ-1рОВ12 в сравнении с исходным штаммом СТИ-1 оценивали по характеру иммунной перестройки организма морских свинок и по устойчивости вакцинированных морских свинок, золотистых хомячков и кроликов к заражению вирулентной культурой возбудителя сибирской язвы.

С целью определения иммунной перестройки организма использовали кожно-аллергическую пробу с антраксином, которую выполняли по существующей методике на морских свинках через 10 и 20 дней после подкожного введения спорных культур вакцинных штаммов в дозах по 50 × 10⁶ спор. Наблюдения показали, что штамм СТИ-1рОВ12 вызывал иммуно-аллергическую перестройку организма морских свинок в такой же степени, как и вакцина на основе штамма СТИ-1. Если через 10 суток кожно-аллергическая проба была положительной у 70–80% животных, то через 20 суток – у 90–100%.

Качественную оценку иммуногенности провели на морских свинках, вакцинированных споровой культурой штам-

мов СТИ-1рОВ12 или СТИ-1 в дозах по 50 × 10⁶ спор и зараженных через 3 нед. споровой культурой штамма 71/12 (второй вакцины Ценковского) в дозе 1 × 10⁶ спор. Исследования показали, что из числа морских свинок, иммунизированных штаммом СТИ-1рОВ12, погибло до 10% животных, а привитых вакциной СТИ – до 40% при гибели всех контрольных (неиммунизированных) животных.

Количественную оценку иммуногенности провели на морских свинках, привитых штаммами СТИ-1рОВ12 или СТИ-1 в дозах по 1 × 10⁶ спор. Через 3 нед. привитых и интактных животных заразили подкожно разными дозами споровой культуры штамма 71/12 второй вакцины Ценковского. Через 10 суток наблюдения на основании количества погибших животных рассчитали величины LD₅₀ в опытных и контрольной группах и по их соотношению определили индекс иммунитета.

Результаты испытаний показали, что штамм СТИ-1рОВ12 по иммунному индексу несколько превосходит штамм СТИ-1 (5700 и 3700 соответственно).

В эксперименте на хомячках оценили эффективность иммунизации различными вакцинными штаммами СТИ-1рОВ12, СТИ-1 и №55 ВНИИВВиМ. Животным подкожно вводили по 1 × 10⁸ спор в объеме 0,5 см³. Через две недели привитых и интактных животных заразили подкожным введением разных доз споровой культуры вирулентных штаммов 81/1 или 3-706. По результатам заражения рассчитали величины LD₅₀ и индекс иммунитета. Полученные результаты приведены в табл. 1.

Эксперименты на хомячках показали высокую иммунологическую эффективность штамма СТИ-1рОВ12, находящуюся на одном уровне с вакцинными штаммами СТИ-1 и №55 ВНИИВВиМ.

В опытах на кроликах оценили серологические сдвиги и устойчивость к заражению возбудителем сибирской язвы после однократного подкожного введения 1 × 10⁸ спор штамма СТИ-1рОВ12, а также вакцинных штаммов СТИ-1 или №55 ВНИИВВиМ. Сероконверсию у иммунизированных животных определяли по уровню ПСС. Показатели ПСС вне зависимости от вакцинного штамма составили 70–80%. На 22-е сутки вакцинированных и интактных кроликов заразили подкожно разными дозами спорных культур вирулентных штаммов 81/1 или 3-706. По результатам гибели животных при 10-суточном наблюдении рассчитали величины LD₅₀ и иммунного индекса (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о высокой иммунологической эффективности штамма СТИ-1рОВ12.

Проведенные исследования показали, что придание штамму СТИ-1 дополнительных признаков гемолитической и лецитиназной активностей *B. cereus* изменило иммуногенные свойства. Вакцинный штамм СТИ-1рОВ12 защищал от заражения вирулентными штаммами 81/1, Ч-7 или 3-706 в большей степени, чем штамм СТИ-1. Следует отметить, что вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1рОВ12 защитил от заражения вирулентным вакцинорезистентным штаммом *B. anthracis* Ч-7SphPlcEr.

Увеличение иммуногенности штамма СТИ-1рОВ12 можно, по-видимому, объяснить приобретением клетками нового свойства – повышения приживляемости в результате «разрыхляющего» действия сфингомиелиназы и фосфолипазы на фосфолипидные мембраны эукариотических клеток.

Таблица 1. Иммунологическая эффективность варианта вакцинного штамма СТИ-1рОВ12 в опытах на хомячках

Вакцинные штаммы (вакцинация)	Вирулентные штаммы (заражение)	Величины LD ₅₀ , спор	Индекс иммунитета
СТИ-1рОВ12	81/1	1480 ± 300	296
СТИ-1рОВ12	3-706	3800 ± 600	422
СТИ-1	81/1	1610 ± 300	322
СТИ-1	3-706	170 ± 5	19
№55 ВНИИВВиМ	81/1	1450 ± 270	290
Не вакцинированные	81/1	5 ± 3	-
Не вакцинированные	3-706	9 ± 4	-

Таблица 2. Иммунологическая эффективность варианта вакцинного штамма СТИ-1рОВ12 в опытах на кроликах

Вакцинные штаммы (вакцинация)	Вирулентные штаммы (заражение)	Величины LD ₅₀ , спор	Индекс иммунитета
СТИ-1рОВ12	81/1	10660 ± 400	130
СТИ-1рОВ12	3-706	15904 ± 800	142
СТИ-1	81/1	7790 ± 550	95
СТИ-1	3-706	9184 ± 1200	82
№55 ВНИИВВиМ	81/1	8870 ± 630	108
Не вакцинированные	81/1	82 ± 5	-
Не вакцинированные	3-706	112 ± 11	-

После хранения споровой культуры в 30%-м растворе глицерина в течение 18 лет были изучены свойства штамма СТИ-1рОВ12, в том числе устойчивость к эритромицину; гемолитическая и лецитиназная активности. Было показано, что длительное хранение не оказало влияния на основные свойства штамма.

Заключение

В ГНЦ ПМБ получен вариант вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1рОВ12, отличающийся от исходного штамма СТИ-1 повышенной иммуногенностью, приобретением гемолитической и лецитиназной активностей, способностью расти на среде с эритромицином. Штамм СТИ-1рОВ12 депонирован в Коллекции «ГКПМ-Оболенск» под номером В-7214.

Штамм является перспективным для профилактики сибирской язвы при возможном инфицировании возбудителем, обладающим повышенной вирулентностью.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectorial 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

- Бургасов ПН, Черкасский БЛ, Кноп АГ, и др. Предварительные данные об иммунологической эффективности вакцины СТИ (по материалам контролируемого эпидемиологического опыта). В сб.: Вопросы эффективности противосибирезвенных мероприятий. Матер. Всесоюз. науч. симпозиума IX Пленарного заседания междуведомств. научно-методич. комиссии по борьбе с сибирской язвой. М., 1974, с. 84-85.
- Бургасов ПН, Черкасский БЛ, Кноп АГ, Утегенов КА. Эпидемиологическая эффективность сибирезвенной вакцины СТИ. Журнал микробиологии. 1976;9:27-35.
- Абалакин ВА. Закономерности врожденного и приобретенного иммунитета против сибирской язвы. Дисс. ... докт. мед. наук. М., 1990, 360 с.
- Марчук ЛМ, Черкасский БЛ. О заболеваемости сибирской язвой людей, привитых вакциной СТИ. В сб.: Актуальные вопросы профилактики сибирской язвы в СССР: Материалы VII Пленарного засед. Междуведомств. комиссии по борьбе с сибирской язвой. М., 1971, с. 95-97.
- Сергеева ЛВ. О заболеваемости сибирской язвой среди привитых против нее людей. Сб. науч. трудов Московского НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. М., 1981, с. 173-6.
- Сергеева ЛВ. Пути совершенствования вакцинопрофилактики сибирской язвы у людей. Дисс. ... канд. мед. наук. М., 1982, 148 с.
- Садовой НВ. Конструирование и изучение основных свойств комбинированной вакцины против сибирской язвы в экспериментальных условиях и в наблюдениях на добровольцах. Тез. докл. Межвед. науч. конф. «Актуальные вопросы профилактики опасных инфекционных заболеваний». Киров, 1991, с. 97-99.
- Садовой НВ, Кравец ИД, Селиваненко ГН, и др. Вакцина сибирезвенная комбинированная. Патент 2115433 RU, 1998.
- Бакулов ИА, Гаврилов ВА, Селиверстов ВВ. Сибирская язва (Антракс): Новые страницы в изучении «старой» болезни. Владимир: «Посад»; 2001, 284 с.
- Буравцева НП, Фунтикова ТН, Цыганкова ОИ, Проскурина ВА. Сравнительная характеристика иммуногенности и безвредности живых сибирезвенных вакцин. Матер. научно-практич. конфер., посвящ. 100-летию образования противочум. Службы в России. Т. 2. Саратов, 1997, с. 248.
- Гаврилов ВА. Сравнительное изучение биологических свойств вакцинных и эпизоотических штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных на территории СССР. Дисс. ... канд. биол. наук. Покров: ВНИИВВиМ; 1974, 115 с.
- Ипатенко НГ, Гаврилов ВА, Маничев АА, и др. Опыт профилактики сибирской язвы сельскохозяйственных животных в России. Ветеринария. 1995;5:27-30.
- Auerbach S, Wright GG. Studies on immunity in anthrax. VI. Immunizing activity of protective antigen against various strains of *Bacillus anthracis*. J Immunol. 1955 Aug;75(2):129-33
- Brossier F, Levy M, Mock M. Anthrax spores make an essential contribution to vaccine efficacy. Infect Immun. 2002 Feb;70(2):661-4. DOI: 10.1128/IAI.70.2.661-664.2002
- Little SF, Knudson GB, Neidhardt FC. Immunizing activity of anthrax vaccines against aberrant strains of *B. anthracis*. ASM, Washington. Abst Ann Meet Amer Soc Microbiol. 1984, 46 p.
- Ward MK, McGann VG, Hogge AL Jr, Huff ML, Kanode RG Jr, Roberts EO. Studies on anthrax infections in immunized guinea pigs. J Infect Dis. 1965 Feb;115:59-67. DOI: 10.1093/infdis/115.1.59
- Лукьянова СВ, Кравец ЕВ, Шкаруба ТТ. Сибирезвенные вакцины и перспективы их совершенствования. Инфекционные болезни. 2011;9(1):51-6.
- Онищенко ГГ. Актуальные проблемы профилактики инфекционных болезней на современном этапе. Журнал микробиологии. 2010;4:13-22.
- Онищенко ГГ, Кожухов ВВ, Васильев НТ, и др. Сибирская язва: актуальные проблемы разработки и внедрения медицинских средств защиты. Под ред. Онищенко ГГ, Кожухова ВВ. М.: Медицина; 2010, 424 с.
- Пименов ЕВ, Дармов ИВ, Васильев НТ, и др. Состояние вопроса и перспективы разработки вакцин против сибирской язвы. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2002;5:42-6.
- Turnbull PC. Anthrax vaccines: past, present and future. Vaccine. 1991 Aug;9(8):533-9. DOI: 10.1016/0264-410x(91)90237-z.
- Turnbull PC. Current status of immunization against anthrax: old vaccines may be here to stay for a while. Curr Opin Infect Dis. 2000 Apr;13(2):113-120. DOI: 10.1097/00001432-200004000-00004
- Wang JY, Roehrl MH. Anthrax vaccine design: strategies to achieve comprehensive protection against spore, bacillus, and toxin. Med Immunol. 2005 Mar 24;4(1):4. DOI: 10.1186/1476-9433-4-4
- Медуницын НВ. Лечебные вакцины. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2002;3-4:25-7.
- Фунтикова ТН, Цыганкова ОИ, Еременко ЕИ, Буравцева НП. Способ отбора культур сибирезвенных вакцинных штаммов и изготовленных из них вакцин. Заявка на изобретение 95119623/13 21.11.1995. Опубликовано 20.12.1998.
- Цыганкова ОИ. Гемолитическая и протеолитическая активность сибирезвенного микроба. Дисс. ... канд. мед. наук. Саратов, 1993, 179 с.
- Цыганкова ОИ, Фунтикова ТН, Буравцева НП, Еременко ЕИ. Изучение некоторых свойств субкультур сибирезвенного вакцинного штамма СТИ-1 *in vitro*. В сб.: Иммунология и специфическая профилактика особо опасных инфекций. Матер. Росс. науч. конф. Саратов, 1993, 192 с.
- Pomerantsev AP, Staritsin NA, Mockov YuV, Marinin LI. Expression of cereolysine AB genes in *Bacillus anthracis* vaccine strain ensures protection against

- experimental hemolytic anthrax infection. *Vaccine*. 1997 Dec;15(17-18):1846-50. DOI: 10.1016/s0264-410x(97)00132-1
29. Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Мокриевич АН, и др. Методы изучения биологических и молекулярно-генетических свойств возбудителя сибирской язвы. Под ред. Дятлова ИА. Москва: Издательство «Династия»; 2021, 240 с.
 30. Основные требования к вакцинным штаммам сибиреязвенного микроба для иммунизации людей: Методические указания. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России; 2002, 47 с.
 31. Ашмарин ИП, Воробьев АА. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962, 180 с.
 32. Гавриленко ИВ, Байда ГЕ, Карпов АВ, Кузьмин НП. Нуклеотидная последовательность *Bacillus anthracis* генов фосфолипазы и сфингомиелидазы *Bacillus cereus* ВКМ-В164. *Биоорганическая химия*. 1993;19(1):133-8.
 33. Сазыкин ИС, Кузьмин НП. Клонирование области генов фосфолипазы С и сфингомиелиназы антракоидной группы рода *Bacillus*. Эпидемиология, микробиология и иммунология бактериальных и вирусных инфекций. Тез. докл. Областной науч. конф. молодых ученых. Ростов-на-Дону, 1989, с. 150-2.
 34. Чалисов ИА, Тамарин АЛ. Патоморфология и бактериология иммунизаторного процесса при сибиреязвенной вакцине СТИ. Сб. работ НИИЭГ Красной Армии, 1946, с. 114-141.
 12. Ipatenko NG, Gavrilo V A, Manichev AA, et al. Experience in the prevention of anthrax of farm animals in Russia. *Veterinariya*. 1995;5:27-30. (In Russian).
 13. Auerbach S, Wright GG. Studies on immunity in anthrax. VI. Immunizing activity of protective antigen against various strains of *Bacillus anthracis*. *J Immunol*. 1955 Aug;75(2):129-33
 14. Brossier F, Levy M, Mock M. Anthrax spores make an essential contribution to vaccine efficacy. *Infect Immun*. 2002 Feb;70(2):661-4. DOI: 10.1128/IAI.70.2.661-664.2002
 15. Little SF, Knudson GB, Neidhardt FC. Immunizing activity of anthrax vaccines against aberrant strains of *B. anthracis*. ASM, Washington. Abst Ann Meet Amer Soc Microbiol. 1984, 46 p.
 16. Ward MK, McGann VG, Hogge AL Jr, Huff ML, Kanode RG Jr, Roberts EO. Studies on anthrax infections in immunized guinea pigs. *J Infect Dis*. 1965 Feb;115:59-67. DOI: 10.1093/infdis/115.1.59
 17. Lukyanova SV, Kravets EV, Shkaruba TT. Anthrax vaccines and potential for their improvement. *Infekc. bolezni (Infectious Diseases)*. 2011;9(1):51-6. (In Russian).
 18. Onishchenko GG. Actual problems of prevention of infectious diseases at the present stage. *Journal of Microbiology*. 2010;4:13-22. (In Russian).
 19. Onishchenko GG, Kozhukhov BB, Vasiliev NT, et al. Anthrax: actual problems of development and implementation of medical protective equipment. Edited by Onishchenko GG, Kozhukhov VV. Moscow: "Medicine" Publ.; 2010, 424 p. (In Russian).
 20. Pimenov EV, Darmov IV, Vasiliev NT, et al. The state of the issue and prospects for the development of anthrax vaccines. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2002;5:42-6. (In Russian).
 21. Turnbull PC. Anthrax vaccines: past, present and future. *Vaccine*. 1991 Aug;9(8):533-9. DOI: 10.1016/0264-410x(91)90237-z.
 22. Turnbull PC. Current status of immunization against anthrax: old vaccines may be here to stay for a while. *Curr Opin Infect Dis*. 2000 Apr;13(2):113-120. DOI: 10.1097/00001432-200004000-00004
 23. Wang JY, Roehrl MH. Anthrax vaccine design: strategies to achieve comprehensive protection against spore, bacillus, and toxin. *Med Immunol*. 2005 Mar 24;4(1):4. DOI: 10.1186/1476-9433-4-4
 24. Medunitsyn NV. Therapeutic vaccines. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2002;3-4:25-7. (In Russian).
 25. Funtikova TN., Tsygankova OI, Eremenko EI, Buravtseva NP. A method for selecting cultures of anthrax vaccine strains and vaccines made from them. Application for invention 95119623/13 21.11.1995. Published on 20.12.1998. (In Russian).
 26. Tsygankova OI. Hemolytic and proteolytic activity of the anthrax microbe. Diss. Saratov, 1993, 179 p. (In Russian).
 27. Tsygankova O I, Funtikova TN, Buravtseva NP, Eremenko EI. Study of some properties of subcultures of the anthrax vaccine strain STI-1 *in vitro*. In: Immunology and specific prevention of particularly dangerous infections. Proceedings of Russian Scientific Conference. Saratov, 1993, 192 p. (In Russian).
 28. Pomerantsev AP, Staritsin NA, Mockov YuV, Marinin LI. Expression of cereolysine AB genes in *Bacillus anthracis* vaccine strain ensures protection against experimental hemolytic anthrax infection. *Vaccine*. 1997 Dec;15(17-18):1846-50. DOI: 10.1016/s0264-410x(97)00132-1
 29. Marinin LI, Dyatlov IA, Mokrievich AN, et al. Methods of studying the biological and molecular genetic properties of the causative agent of anthrax. Edited by Dyatlov IA. Moscow: Publishing House "Dynasty"; 2021, 240 p. (In Russian).
 30. Basic requirements for vaccine strains of anthrax microbe for human immunization: Guidelines. Moscow: Federal Center of State Sanitary and Epidemiological Supervision of the Ministry of Health of the Russian Federation; 2002, 47 p. (In Russian).
 31. Ashmarin IP, Vorobyov AA. Statistical methods in microbiological research. L.: "Medgiz" Publ.; 1962, 180 p. (In Russian).
 32. Gavrilenko And V, Bayda GE, Karpov AV, Kuzmin NP. The nucleotide sequence of *Bacillus anthracis* phospholipase and sphingomyelidase genes of *Bacillus cereus* ВКМ-В164. *Biomeditsinskaya Khimiya*. 1993;19(1):133-8. (In Russian).

References

33. Sazykin IS, Kuzmin NP. Cloning of the region of phospholipase C and sphingomyelinase genes of the anthracoid group of the genus *Bacillus*. *Epidemiology, microbiology and immunology of bacterial and viral infections*. Proceedings of Regional Scientific Conference of Young scientists. Rostov-on-Don, 1989, pp. 150-2. (In Russian).
34. Chalisov IA, Tamarin AL. Pathomorphology and bacteriology of the immunizing process with anthrax vaccine STI. *Proceedings of the NIEG of the Red Army*, 1946, pp. 114-141. (In Russian).

Информация о соавторах:

Шишкова Нина Андреевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Тюрин Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник лаборатории биологической безопасности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Мокриевич Александр Николаевич, доктор медицинских наук, заведующий отделом особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Information about co-authors:

Nina A. Shishkova, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher Laboratory of Anthrax Microbiology Department of Particularly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Eugene A. Tyurin, MD, PhD, Leading Researcher of the Laboratory of Biological Safety, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Alexander N. Mokrievich, MD, PhD, DSc, Head of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

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

НОВОСТИ НАУКИ

Синтезированы аналоги нового антибиотика

Последнее исследование группы профессора Сатоши Итикава из Университета Хоккайдо, опубликованное в журнале *Nature Communications*, подробно описывает разработку высокоэффективного антибактериального соединения, эффективного против наиболее распространенных бактерий с множественной лекарственной устойчивостью.

Ученые работали над сферимицинами. Эти соединения блокируют функцию белка MraY в бактериях, необходимого для репликации и играющего роль в синтезе бактериальной клеточной стенки. Он также не является мишенью для доступных в настоящее время коммерческих антибиотиков.

Сферимицины имеют очень сложную структуру, поэтому решили разработать аналоги этой молекулы, которые были бы проще в производстве, а также становились бы более эффективными против MraY, тем самым повышалась бы их антибактериальная активность. Разработанный препарат был эффективен против метициллин-резистентного золотистого стафилококка (MRSA) и ванкомицин-резистентного *Enterococcus faecium* (VRE).

Команда проанализировала структуры сферимицина А с помощью молекулярного моделирования, а также разработала и синтезировала два аналога сферимицина, SPM1 и SPM2. Было обнаружено, что эти аналоги эффективны против грамположительных бактерий.

Затем установили структуру SPM1, связанного с MraY, и определили, как еще больше упростить молекулы. Удалось разработать более простой аналог SPM3, активность которого была аналогична SPM1.

В дополнение к эффективности против MRSA и VRE, СЗМ были также эффективны против *Mycobacterium tuberculosis*, штаммы которых обладают множественной лекарственной устойчивостью.

Наиболее значительным вкладом является создание основного скелета сферимицина, который можно использовать для разработки большего количества антибактериальных агентов, нацеленных на MraY и, следовательно, на штаммы с множественной лекарственной устойчивостью. Будущая работа будет включать оптимизацию разрабатываемых в настоящее время молекул SPM и разработку комбинаций антибиотиков, содержащих сферимицин, для воздействия на более широкий круг бактерий.



Developing antibiotics that target multiple-drug-resistant bacteria – ScienceDaily [Электронный ресурс].

URL: <https://www.sciencedaily.com/releases/2022/12/221220113025.htm>

Методология детекции ботулотоксина типа А на масс-спектрометре типа тройного квадруполья

А.К.Сурин, А.Е.Евтюхова, М.М.Рогозин, И.Г.Шемякин, В.В.Фирстова

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

Ботулинический нейротоксин является самым токсичным природным веществом, которое может привести к летальному исходу без эффективного лечения. Ботулотоксин серотипа А (BoNT/A) – наиболее распространенный и смертельно опасный среди восьми серотипов (от А до Н). Основная проблема идентификации ботулотоксина заключается в низкой чувствительности методов. Масс-спектрометрия позволяет с высокой точностью идентифицировать ботулотоксин. Для сокращения времени анализа и повышения чувствительности метода нами были выявлены наиболее часто встречаемые пептиды ботулотоксина типа А.

В работе были проанализированы 8 образцов ботулотоксина А легкой и тяжелой цепей, имеющих различную концентрацию и выделенных в различное время разными исследователями. Были отобраны пептиды ботулотоксина типа А, которые получают при его ферментативном расщеплении трипсином и имеют наибольшую вероятность присутствия в продуктах гидролиза. Для этих пептидов были выделены наиболее характерные ионы фрагментов для составления списка оптимальных ММР-переходов, которые можно использовать для детекции ботулотоксина в различных матрицах.

Ключевые слова: ботулотоксин, нейротоксин, масс-спектрометрия, ММР, масс-хроматограмма

Для цитирования: Сурин А.К., Евтюхова А.Е., Рогозин М.М., Шемякин И.Г., Фирстова В.В. Методология детекции ботулотоксина типа А на масс-спектрометре типа тройного квадруполья. Бактериология. 2023; 8(1): 30–36. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-30-36

Methodology for the detection of botulinum toxin type A on a triple quadrupole mass spectrometer

A.K.Surin, A.E.Evtyukhova, M.M.Rogozin, I.G.Shemyakin, V.V.Firstova

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

Botulinum neurotoxin is the most toxic natural substance that can cause death without effective treatment. Botulinum toxin of serotype A (BoNT/A) is the most common and deadly among the eight serotypes (from A to H). The main problem of identifying the botulinum toxin is the low sensitivity of the methods. Mass spectrometry reduce errors in protein identification to a minimum. To reduce analysis time and increase sensitivity, the most commonly occurring botulinum toxin type A peptides were identified. In this work, 8 samples of botulinum toxin A of light and heavy chains having different concentrations and isolated at different times by different researchers were analyzed. The peptides of botulinum toxin type A which are obtained during its enzymatic cleavage by trypsin and have the highest probability of being present in hydrolysis products were selected. The most characteristic fragment ions for these peptides were isolated to compile a list of optimal MRM transitions for monitoring the presence of this toxin in food and blood plasma.

Key words: botulinum toxin, neurotoxin, mass spectrometry, MRM, mass chromatogram

For citation: Surin A.K., Evtyukhova A.E., Rogozin M.M., Shemyakin I.G., Firstova V.V. Methodology for the detection of botulinum toxin type A on a triple quadrupole mass spectrometer. Bacteriology. 2023; 8(1): 30–36. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-30-36

Для корреспонденции:

Евтюхова Анастасия Евгеньевна, младший 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
Телефон: (4967) 36-0046

Статья поступила 15.02.2023, принята к печати 28.04.2023

For correspondence:

Anastasia E. Evtyukhova, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, 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) 36-0046

The article was received 15.02.2023, accepted for publication 28.04.2023

Ботулотоксины (BoNTs) представляют собой нейротоксины белковой природы восьми (А–Н) типов [1], продуцируемые анаэробными грамположительными спорообразующими бактериями *Clostridium botulinum* (van Ermengem), полулетальные дозы которых (LD_{50}) находятся в диапазоне 1–5 нг/кг массы тела [2]. Молекула нейротоксина ботулизма представлена гетеродимером, первоначально синтезируемым в виде единой полипептидной цепи с молекулярной массой 150 кДа. Его легкая цепь (50 кДа), состоящая из 448 аминокислотных остатков и являющаяся цинковой (Zn^{2+}) эндопептидазой, определяет его токсичность, а тяжелая цепь токсина (100 кДа), включающая аминокислотные остатки с 449 по 1280, ответственна за его связывание с пресинаптическими рецепторами и транслокацию легкой цепи через мембрану эндосом [3].

В настоящее время диагностика ботулинической интоксикации включает комбинацию культурального метода и мышинного летального теста [4]. Несмотря на довольно высокий предел детекции (10–20 пг/мл BoNT/A), она не позволяет получить лабораторное подтверждение заболевания в короткие сроки, поскольку постановка метода может занимать от 4 до 7 суток [5]. Иммуноферментным анализом, проводимым в традиционном формате, можно определять токсин в течение 5–6 ч. Однако его использование для клинической диагностики ботулинической интоксикации нецелесообразно, поскольку детектируемые концентрации токсина (0,5–2,0 нг/мл) находятся вне диагностически значимого диапазона [6]. Методом масс-спектрометрического анализа ботулотоксин может быть детектирован в течение нескольких часов, а использование, например, специфических моноклональных антител позволяет увеличивать чувствительность метода до 1 пг/мл [7].

Целью данной работы было отобрать пептиды ботулотоксина, которые получают при его ферментативном расщеплении трипсином и имеют наибольшую вероятность присутствия в продуктах гидролиза. Для этих пептидов были выделены наиболее характерные ионы фрагментов для составления списка оптимальных ММР-переходов для использования контроля за наличием данного токсина в продуктах питания и плазме крови.

Материалы и методы

Подготовка образцов к проведению масс-спектрометрического анализа

Для выделения чистого рекомбинантного белка применяли метод электрофоретического разделения в полиакриламидном геле. На каждую концентрацию белка приходилось по три повторности. Для визуализации результатов электрофореза использовали окрашивание белков в гелях красителем Кумасси (Coomassie Blue).

Полученные белки вырезали из геля и помещали в эппендорф (1,5 мл). Для удаления SDS (Sodium dodecyl sulfate) использовали метанол (40%) и уксусную кислоту (5%). Для отмывки от красителя Кумасси добавляли 50% ацетонитрил в 50 мМ NH_4HCO_3 и инкубировали при температуре 56°C в течение 30 мин, повторяя этап до полной отмывки.

Восстановление и алкилирование дисульфидных связей проводились с использованием 5 мМ DDT (в течение 30 мин

при температуре 25°C) и 15 мМ йодацетамида (в течение 30 мин при температуре 25°C).

Затем к гелю добавляли ацетонитрил (100%), после удаления которого происходило высушивание геля на вакуумном концентраторе. К полученным образцам добавляли раствор трипсина (0,01 мг/мл) в буфере 50 мМ NH_4HCO_3 и инкубировали 20 ч при температуре 37°C, после чего реакция действия протеаз останавливалась 0,1 TFA (Trifluoroacetic acid) в 80%-м ацетонитриле в течение 60 мин при комнатной температуре. После инкубации гель полностью высушивался в вакуумном концентраторе. Затем образцы растворяли в 4%-м ацетонитриле и 0,1 TFA.

После гидролиза для удаления следов красителя, примеси солей и крупных пептидов проводилась очистка образцов на зип-типах. Зип-тип – это наконечник, набитый стационарной фазой C18, которая выполняет роль фильтра. Фаза C18 в наконечнике промывалась ацетонитрилом (сначала 90%-м, затем 4%-м) с добавлением 0,1 TFA. На подготовленный зип-тип наносился образец, который отмывали с фазы ацетонитрилом (сначала 4%-м, затем 90%-м) с добавлением 0,1 TFA. Полученный образец высушивали на вакуумном концентраторе. Далее хранение белков осуществлялось при температуре 4°C.

Перед масс-спектрометрическим анализом образец растворяли в 4%-м ацетонитриле и 0,1% TFA.

Масс-спектрометрический анализ

Масс-спектрометрический анализ проводили на хромато-масс-спектрометре высокого разрешения. Пептиды, полученные при гидролизе ботулотоксина, предварительно разделяли с помощью нанопотокового хроматографа Easy nLC 1000 (Thermo Scientific, США), масс-спектрометрический анализ пептидов проводили на масс-спектрометре Orbitrap Elite (Thermo Scientific, Германия). Пептиды разделяли на капиллярной колонке диаметром 75 мкм и длиной 200 мм, набитой в лабораторных условиях частицами 3,6 мкм с порами 90 Å с привитой фазой C18. Образец элюировали в градиенте ацетонитрила в воде в присутствии 0,1% TFA. Изменение концентрации ацетонитрила с 4% по 50% проводили линейно в течении 120 мин. Смываемые с колонки пептиды ионизировали методом электрораспыления. Панорамные масс-спектры снимали в диапазоне от 300 до 1600 m/z . После каждого панорамного спектра снимали 10 спектров фрагментации для наиболее интенсивных ионов. Фрагментацию ионов проводили методом активации соударениями с молекулами инертного газа ДАС ((диссоциация, активированная соударениями) в высокоэнергетической ячейке соударений.

Обработка результатов масс-спектроскопических исследований

Данные масс-спектрометрического анализа обрабатывали с помощью коммерческих программ PeaksStudio 7.5 и Xcalibur 2.2.

Результаты и обсуждение

Стандартная процедура идентификации белка методом масс-спектрометрии основана на предварительном гидроли-

зе целевых белков одной или несколькими протеазами и последующем анализе на хромато-масс-спектрометре. В качестве протеазы нами была использована сериновая протеаза трипсин, которая расщепляет пептидные связи типа Arg-Xxx и Lys-Xxx, где Xxx может быть любая аминокислота за исключением пролина. Расщепленный трипсином белковый субстрат подвергают очистке от солей и больших недорасщепленных пептидов. Очищенные пептиды разделяли на колонке с обращенной фазой. Смываемые с колонки пептиды анализировали на масс-спектрометре. Для повышения

качества детектирования белков применяли метод tandem mass-спектрометрии, который основан на получении информации о точной массе пептида и взаимном расположении аминокислот в пептиде. В масс-спектрометрах с tandemной конфигурацией ионы пептидов могут подвергаться дополнительному воздействию (столкновению с нейтральным газом – ДАС), что приводит к развалу иона на фрагменты. Ионы-фрагменты, содержащие N-концевую часть пептида, образуют b-серии фрагментов; ионы-фрагменты, содержащие C-конец, образуют y-серии (b_n и y_n , где n – число

Таблица. Результат обработки данных для пептидов

№	Последовательность пептида	Масса (Да)	Встречаемость (из 8 возможных)	Расположение в белке		MMP-переход	
				начало	конец	Родительский ион, m/z	Фрагментный ион
1	FATDPAVTLAHELIIHAGHR	2055,1	8	256	274	1028.5(2+) 686,0 (3+) 514,8 (4+) 412,0 (5+)	811.45(Y15, 2+)* 1069.57(Y9, 1+) 1140,61(Y10, 1+) 1253,69(Y11, 1+) 1354.74(Y12, 1+)
2	SFGHEVLNLTR	1271,7	8	210	220	636.8 (2+)	844.49(Y7, 1+) 981.55(Y8, 1+) 1038.57(Y9, 1+)
3	FSPDFTFGFEESLEVDNPLLGAGK	2716,3	8	231	255	1359.2(2+) 906,4 (3+)	870.50(Y9, 1+) 985.54(Y10, 1+) 1084.61(Y11, 1+) 1213.64(Y12, 1+)
4	LYYYNKFKDIASLTK	1980,0	8	327	342	991.0 (2+) 661,0 (3+)	771,40(Y13, 2+) 852.95(Y14, 2+) 1136.64(Y10, 1+) 1378.77(Y12, 1+) 1541,80(Y13, 1+)
5	FIDSLQENEFR	1396,7	7	316	326	699.3 (2+)	822.38(Y6, 1+) 935.46(Y7, 1+) 1022.49(Y8, 1+) 1137.52(Y9, 1+)
6	FKDIASLTK	1135,6	7	333	342	568.8 (2+)	861.47(Y8, 1+)
7	LISEEDLEDLEQK	1559,8	7	22	34	780.9 (+2) 520,9 (3+)	989.48(Y8, 1+) 1118.53(Y9, 1+) 81247.57(Y10, 1+) 1334.60(Y11, 1+)
8	TYLNFDKAVFK	1344,7	7	408	418	673.4 (2+)	968.52(Y8, 1+) 1081.61(Y9, 1+)
9	VNYTIYDGFNLR	1473,7	7	425	436	737.9 (2+)	884.43(Y7, 1+) 997.51(Y8, 1+) 1098.56(Y9, 1+) 1261.62(Y10, 1+)
10	YLLSEDTSGK	1111,5	7	364	373	556.8 (2+)	723.32(Y7, 1+) 836.40(Y8, 1+)
11	GIPFWGGSTIDTELK	1619,8	7	157	171	810.9 (2+)	1020.52(Y10, 1+) 1206.60(Y11, 1+)
12	IYSTDLGR	923,5	7	141	148	462.7 (2+)	648.33(Y6, 1+) 811.40(Y7, 1+)
13	LYGIAINPNR	1129,6	7	275	284	565.8 (2+)	684.38(Y6, 1+) 854.49(Y8, 1+)
14	ILSALEIPDVGNLSQVVVM (+15.99)K**	2140,2	7	392	411	714.4 (3+) 1071,1(2+)	806.45(Y7, 1+) 1401.67(Y13, 1+)
15	LISEEDLEDLEQK	1559,8	7	22	34	780.9 (2+) 520,9 (3+)	989.48(Y8, 1+) 1118.53(Y9, 1+) 1247.57(Y10, 1+) 1334.60(Y11, 1+)

*В скобках указан тип фрагмента иона и его заряд.

**+15,99 – означает приращение массы у метионина. Это свидетельствует о том, что метионин в этом пептиде находится в окисленной форме.

RT: 0.00 - 90.13 SM: 11B

NL:
6.53E6
TIC MS
Botulotox

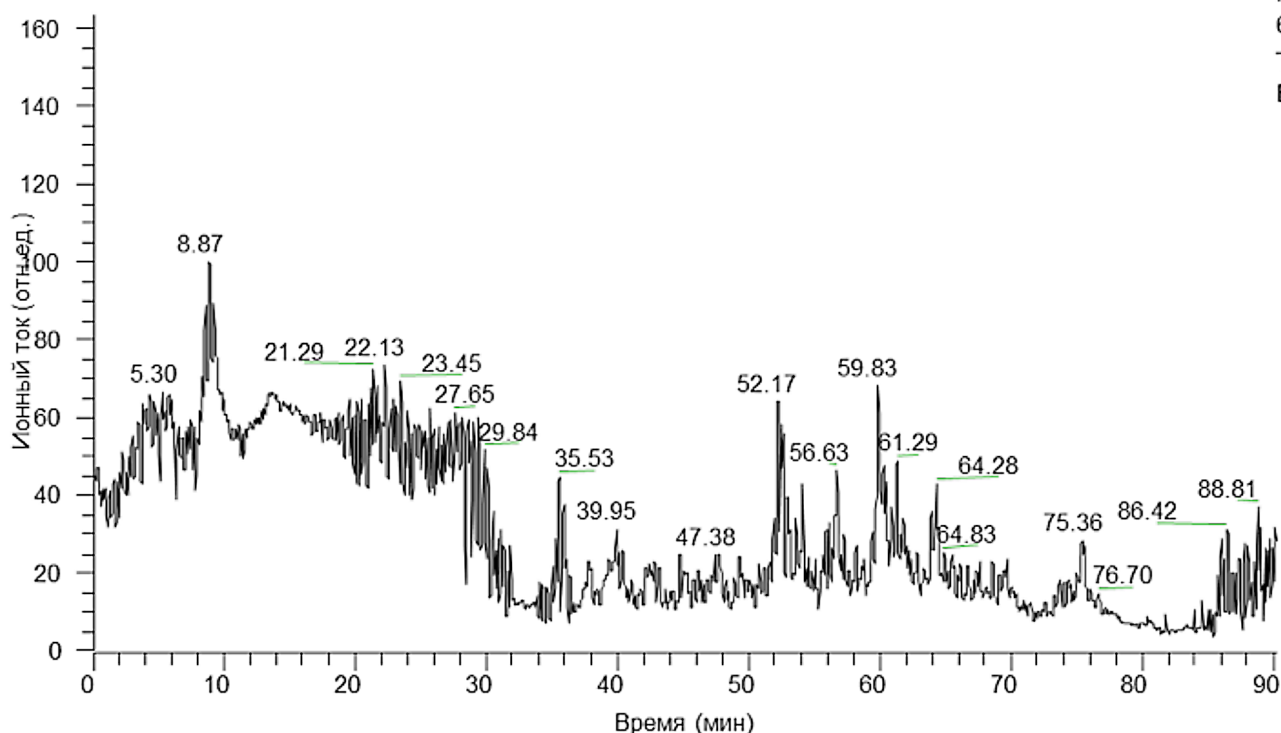
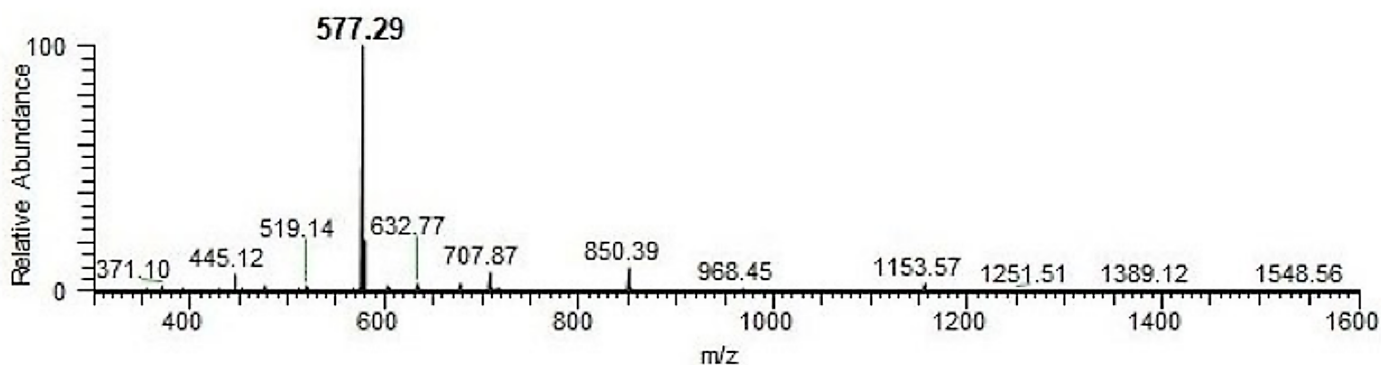


Рис. 1. Масс-хроматограмма в полном ионном токе продуктов гидролиза легкой и тяжелой цепи ботулотоксина типа А. Выход основных пептидов наблюдается с 30-й по 80-й минуту.

Botulotox

RT: 52.14

T: FTMS + p NSI sid=5.00 Full ms [300.00-1600.00]



#

T: FTMS + p NSI sid=5.00 d Full ms2 577.29@hcd29.00 [100.00-1165.00]

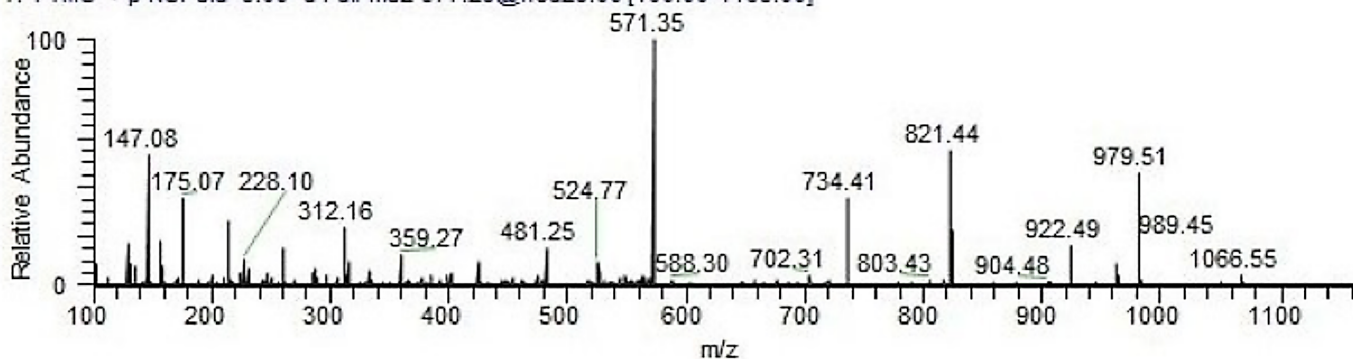


Рис. 2. Панорамный масс-спектр ионов, время выхода 52,14 мин (верх). Спектр фрагментации двухзарядного иона с $m/z = 577,29$ (низ). Диапазон изоляции иона ± 1 , фрагментация, активированная соударением в высокоэнергетической ячейке.

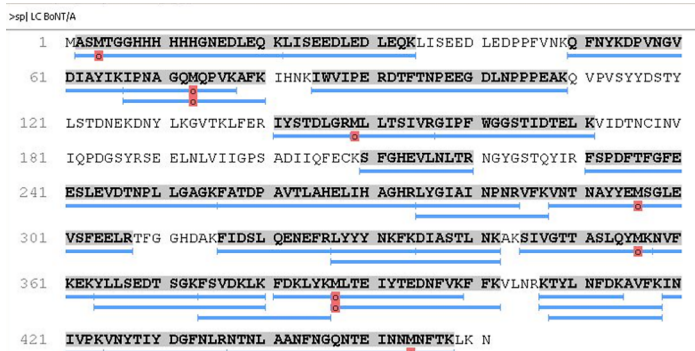


Рис. 3. Результат обработки программой Peaks Studio 7.5 масс-спектрометрических данных. Наложение идентифицированных пептидов на аминокислотную последовательность легкой цепи ботулотоксина типа А. Темным фоном выделены участки аминокислотной последовательности, определенные методом масс-спектрометрии. Внизу последовательности указаны соответствующие найденные пептиды.

аминокислотных остатков, входящих в данный фрагмент). Таким образом, соотношение величин масс фрагментов b и y с различными n для одного и того же пептида будет определять и взаимное расположение аминокислот в этом пептиде. Такой подход для соотнесения пептидов с конкретным белком позволяет свести ошибку в идентификации белка до минимума. С другой стороны, в таком подходе есть существенный недостаток. Он заключается в том, что в случае малой копииности целевого белка относительно других белков, также содержащихся в анализируемом образце, искомые пептиды целевого белка могут быть пропущены при анализе на фоне больших концентраций примесных пептидов. Решением данной проблемы может быть увеличение длительности хроматографического разделения пептидов.

Существует и другой вариант – использовать метод мониторинга множественных реакций (ММР). Данный метод основан на ограниченном контроле определенного числа целевых ионов и их фрагментов. Например, мы программируем наш прибор контролировать для родительского иона 737,87 m/z наличие фрагментарного иона с 997,51 m/z. При этом первый квадруполь работает как фильтр, пропуская ионы с 737,51 m/z. Во втором квадруполье прошедшие ионы сталкиваются с молекулами инертного газа, что приводит к их развалу на фрагменты. Третий квадруполь пропускает только ионы с m/z = 997,51, которые будут регистрироваться на детекторе ионов. Это называется ММР-переход (737,51 → 997,51). Величина m/z родительского иона меньше фрагментарного, так как родительский ион обладал зарядом 2+, в то время как фрагментарный ион – 1+. Работая в режиме ММР, современные приборы с конструкцией тройного квадрупольа способны за 1 с поочередно проконтролировать 100–200 различных переходов. При этом влияние примесных пептидов сводится до минимума. Таким образом можно сократить время разделения пептидов и повысить чувствительность метода.

Для решения данной задачи нами были проанализированы 8 образцов ботулотоксина А легкой и тяжелой цепей, имеющих различную концентрацию и выделенных в различное время разными исследователями. На рис. 1 представлена одна из масс-хроматограмм в полном ионном токе одного из образцов продуктов трипсинового гидролиза токсина. Основной пул пептидов продуктов гидролиза элюировался с

колонки в интервале времени с 30-й по 80-ю минуту. В этом промежутке времени пептиды, сходящие с колонки, ионизовались, далее в автоматическом режиме 10 ионов с максимальной амплитудой сигнала поочередно изолировали и фрагментировали методом ДАС.

На рис. 2 представлен пример работы масс-спектрометра. В начале снимается панорамный масс-спектр ионов, смываемых с колонки (например, на 52,14-й минуте, верхний рисунок), далее выбирается ион с наиболее интенсивным сигналом, этот ион изолируется и подвергается фрагментации. На нижнем рисунке представлен спектр фрагментации ДАС пептида с зарядом 2+ и величиной m/z 577,29. Далее анализируют следующий по амплитуде ион. Таким образом для каждого проанализированного пептида определяли набор масс пептида и его фрагментов. Полученные данные анализировали с использованием коммерческой программы Peaks Studio 7.5, позволяющей получить соответствие полученных комплектов масс пептидам белка.

Результат такого анализа представлен на рис. 3 – аминокислотная последовательность легкой цепи ботулотоксина в однобуквенном коде. Темным фоном отмечены участки полипептидной цепи, для которых были найдены соответствующие пептиды. Эти пептиды указаны отрезками под последовательностью. Литерой «О» отмечены метионины, которые были модифицированы (окисление метионина) в ходе пробоподготовки. Такие наборы данных были получены для всех восьми образцов как для легкой, так и для тяжелой цепи. Так как образцы имели различную концентрацию целевого белка, гидролиз образцов и пробоподготовка проводились в разное время разными исследователями, то число и положение идентифицированных пептидов для них различаются. Далее в ручном режиме были отобраны пептиды, обладающие хорошими спектрами фрагментации и встречавшиеся минимум в семи образцах из восьми. В результате были выбраны 14 пептидов для легкой цепи и два для тяжелой цепи. При этом пептид **LISEEDLEDLEQK** присутствует в гидролизате как легкой, так и тяжелой цепи.

Далее для отобранных целевых пептидов в ручном режиме подбирались пары для ММР-перехода (родительский ион → ион-фрагмент). Предпочтение отдавали наиболее интенсивным ионам-фрагментам с величиной m/z не более 1600. Это ограничение обусловлено тем, что ряд приборов с тройным квадрупольем имеют ограничение верхнего диапазона m/z в районе 1600 единиц.

На рис. 4 представлен фрагмент отчета идентификации пептида **VNYTIYDGFNLR** легкой цепи ботулотоксина. Вверху представлен приведенный масс-спектр (все ионы-фрагменты представлены как однозарядные). Внизу – таблица теоретически рассчитанных ионов-фрагментов (b-серии – слева, y-серии – справа) для пептида с данной последовательностью. Цветом выделены ионы, совпадающие с данными масс-спектрометрического анализа для этого иона. В соответствии с этими данными нами выбирались ионы фрагментов, которые имели высокую амплитуду сигнала, совпадали с теоретически рассчитанными и величина m/z которых была в пределах диапазона 600–1600. На рис. 5 представлен спектр фрагментации пептида **LISEEDLEDLEQK**. Рамками обведены значения m/z ионов-фрагментов, наиболее предпочтительных для ММР-перехода. Результаты итоговой обработ-

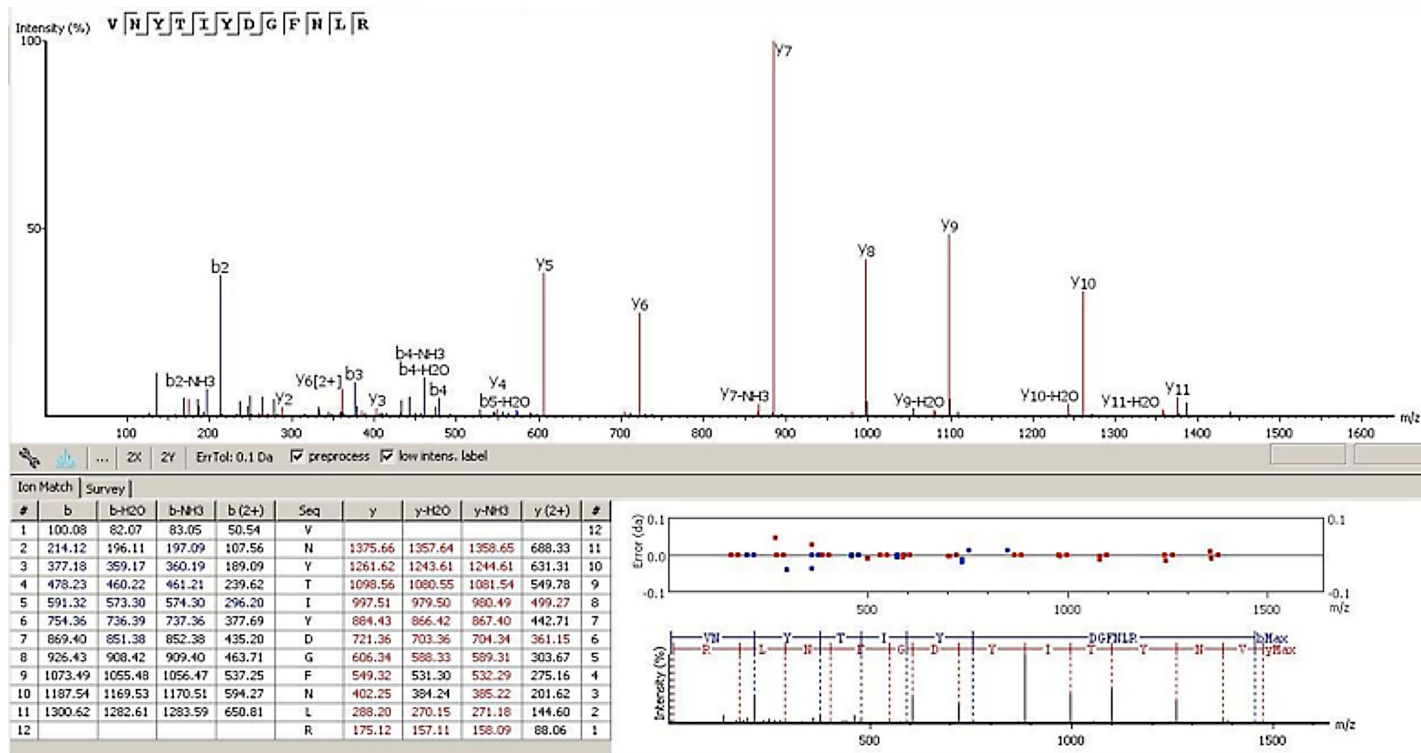


Рис. 4. Результат отчета по идентификации пептида VNYTIYDGFNLR легкой цепи ботулотоксина типа А. Приведенный масс-спектр фрагментации иона пептида (верх), таблица теоретических ионов фрагментов для данного пептида (низ). Цветом выделены b- и y-ионы-фрагменты, совпадающие с пиками на спектре фрагментации.

Botulotox #8259 RT: 70.22 AV: 1 NL: 5.55E4
T: FTMS + p NSI sid=5.00 d Full ms2 737.87@hcd29.00 [100.00-1490.00]

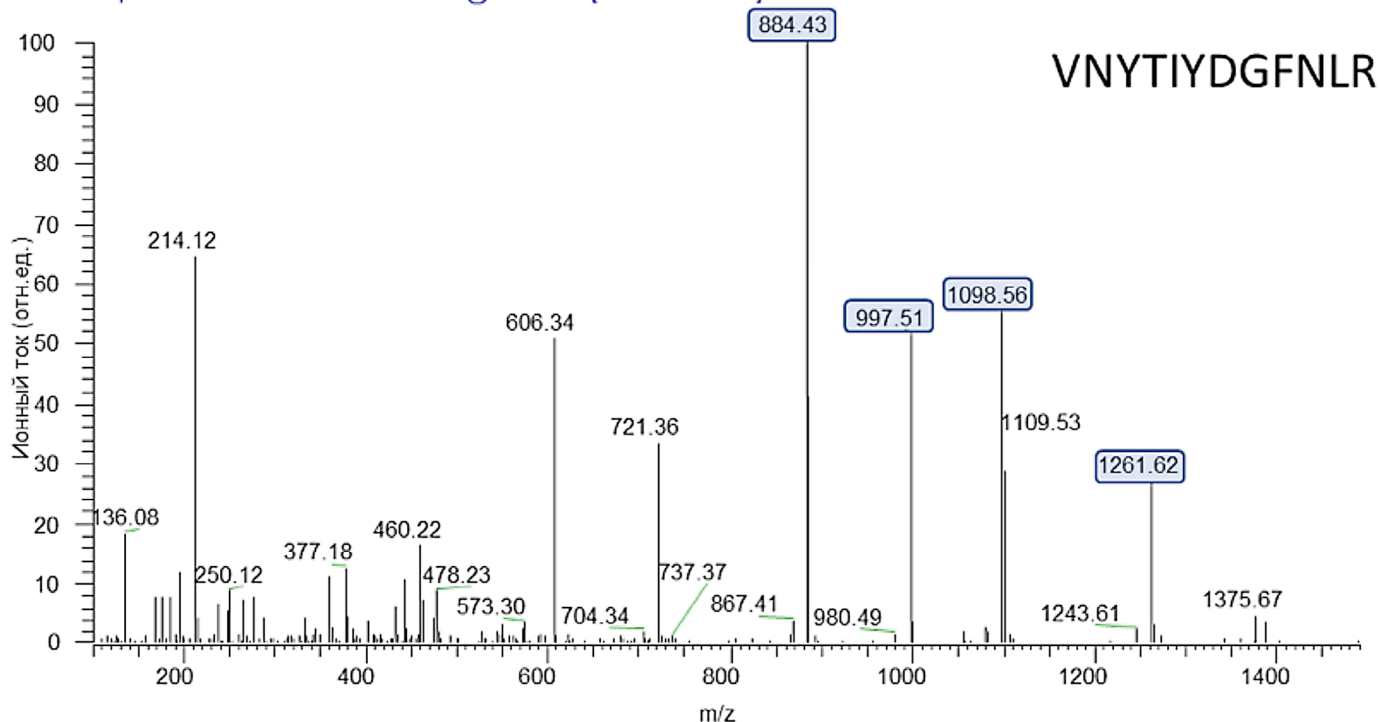


Рис. 5. Спектр фрагментации двухзарядного иона $m/z = 737,87$ пептида VNYTIYDGFNLR ботулотоксина типа А. Рамками на спектре выделены величины m/z ионов-фрагментов, выбранных в качестве характерных для MRM-переходов.

ки данных для всех 15 пептидов объединены в сводную таблицу. В колонку «родительский ион» внесены значения m/z родительского иона и его заряд. В случаях, когда родительские ионы пептидов были представлены одновременно

в виде ионов с различными зарядами, в таблицу вносились все возможные варианты. Так, например, пептид **FATDPAVTLANELIHAGHR** (№1) встречается в виде ионов с зарядом 2+, 3+, 4+ и 5+, при этом для него выбраны 5 воз-

можных ионов-фрагментов, следовательно, для этого пептида необходимо рассматривать 20 MMP-переходов либо выбрать наиболее предпочтительные (с учетом конкретного масс-спектрометрического детектора).

Заключение

Определены 15 пептидов ботулинического токсина типа А для использования их в качестве целевых пептидов при экспресс-определении наличия данного токсина в продуктах питания методом масс-спектрометрии на приборах типа тройного квадруполь. Выбраны оптимальные родительские ионы и ионы-фрагменты для MMP-переходов. Полученная база данных MMP переходов необходима для определения присутствия ботулотоксина с использованием масс-спектрометрических приборов с конструкцией тройной квадруполь, которые используются преимущественно при целевом анализе. Создаваемая нами база данных также может быть использована для анализа масс-спектрометрических данных, полученных на Q-TOF (квадруполь времяпролетный масс-спектрометр), масс-анализаторов типа орбитальных и линейных ловушек. Таким образом, база данных может применяться для широкого спектра различных масс-анализаторов.

Информация о финансировании

Работа выполнена по НИОКР 1.1.14 в рамках государственного задания.

Funding information

The work was carried out within the framework of R&D 1.1.14. 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

1. Peck MW, Smith TJ, Anniballi F, Austin JW, Bano L, Bradshaw M, et al. Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature. *Toxins (Basel)*. 2017 Jan 18;9(1):38. DOI: 10.3390/toxins9010038

2. Schantz EJ, Johnson EA. Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. *Microbiol Rev*. 1992 Mar;56(1):80-99. DOI: 10.1128/mr.56.1.80-99.1992
3. Carter AT, Peck MW. Genomes, neurotoxins and biology of *Clostridium botulinum* Group I and Group II. *Res Microbiol*. 2015 May;166(4):303-17. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.10.010
4. Singh AK, Stanker LH, Sharma SK. Botulinum neurotoxin: where are we with detection technologies? *Crit Rev Microbiol*. 2013 Feb;39(1):43-56. DOI: 10.3109/1040841X.2012.691457
5. Lindström M, Myllykoski J, Sivelä S, Korkeala H. *Clostridium botulinum* in cattle and dairy products. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2010 Apr;50(4):281-304. DOI: 10.1080/10408390802544405
6. Masters AM, Palmer DG. Confirmation of botulism diagnosis in Australian bird samples by ELISA and RT rtPCR. *J Vet Diagn Invest*. 2021 Jul;33(4):684-694. DOI: 10.1177/10406387211014486
7. Cheng LW, Henderson TD 2nd, Lam TI, Stanker LH. Use of Monoclonal Antibodies in the Sensitive Detection and Neutralization of Botulinum Neurotoxin Serotype B. *Toxins (Basel)*. 2015 Nov 27;7(12):5068-78. DOI: 10.3390/toxins7124863

Информация о соавторах:

Сурин Алексей Константинович, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Рогозин Метхун Мадидронович, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Фирстова Виктория Валерьевна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Alexey K. Surin, PhD (Physical and Mathematical Sciences), Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebнадзор

Metkhun M. Rogozin, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebнадзор

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

Victoria V. Firstova, PhD, DSc (Biological Science), Chief Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebнадзор

Изучение ростовых свойств питательных сред и валидация методов по выделению бактерий родов *Proteus* и *Providencia* из кормов для животных

А.А.Кремлева¹, О.В.Полосенко²

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

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

Высокая концентрация бактерий родов *Proteus* и *Providencia* в кишечнике животных является негативным фактором, который способен снизить устойчивость организма к развитию патологий желудочно-кишечного тракта. В этой связи при санитарно-гигиенической оценке кормов для животных определение протеов является обязательным.

Для проведения валидационных процедур в ветеринарных лабораториях были изучены биологические показатели качества плотных и жидких (накопительных) питательных сред разных производителей при изучении изолятов бактерий родов *Proteus* и *Providencia*, выделенных из кормов для животных.

Было установлено, что использование селективной питательной среды с маннитом, желчью и полимиксином для выявления бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* предпочтительнее для получения адекватного результата при росте уреазоположительных протеов.

Ключевые слова: питательные среды, бактерии родов *Proteus* и *Providencia*, валидация

Для цитирования: Кремлева А.А., Полосенко О.В. Изучение ростовых свойств питательных сред и валидация методов по выделению бактерий родов *Proteus* и *Providencia* из кормов для животных. Бактериология. 2023; 8(1): 37–42. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-37-42

Studying the growth properties of nutrient media and validation of methods for isolation of *Proteus* and *Providencia* bacteria from animal feed

A.A.Kremleva¹, O.V.Polosenko²

¹Federal Centre for Animal Health (FGBI "ARRIAH"), Moscow, Russian Federation;

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

A high concentration of bacteria of the genera *Proteus* and *Providencia* in the intestines of animals is a negative factor that can reduce the organism's resistance to the development of pathologies of the gastrointestinal tract. In this regard, the determination of *Proteus* is mandatory in the sanitary and hygienic assessment of animal feed.

To carry out validation procedures in veterinary laboratories, biological indicators of the quality of solid and liquid (accumulative) nutrient media from different manufacturers have been studied when studying isolates of bacteria of the *Proteus* and *Providencia* genera isolated from animal feed.

It was found that the use of a selective nutrient medium with mannitol, bile and polymyxin to detect bacteria of the genera *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* is preferable to obtain an adequate result in the growth of urease-positive proteas.

Key words: culture media, *Proteus*, *Providencia*, validation

For citation: Kremleva A.A., Polosenko O.V. Studying the growth properties of nutrient media and validation of methods for isolation of *Proteus* and *Providencia* bacteria from animal feed. Bacteriology. 2023; 8(1): 37–42. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-37-42

Для корреспонденции:

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

Адрес: 111622, Москва, ул. Оранжерейная, 23

Телефон: (495) 700-0137

Статья поступила 20.03.2023, принята к печати 28.04.2023

For correspondence:

Anna A. Kremleva, Researcher, Federal Centre for Animal Health
(FGBI "ARRIAH")

Address: 23 Oranzhereynaya str., Moscow, 111622, Russian Federation

Phone: (495) 700-0137

The article was received 20.03.2023, accepted for publication 28.04.2023

Высокое содержание бактерий рода *Proteus* в организме сельскохозяйственных животных отрицательно сказывается на их здоровье, вызывая трудно поддающиеся лечению желудочно-кишечные заболевания. Попав в организм, протеи быстро колонизируют его, а инфицирование «роящимися» штаммами проявляется стремительным ростом инфекции [13].

Наиболее часто выделяемыми и патогенными для животных являются представители *P. vulgaris* и *P. mirabilis*, которые участвуют в этиопатогенезе кишечных расстройств у молодняка.

Бактерии рода *Providencia* широко распространены в природе, их выделяют из воды, почвы, фекалий и мочи животных и человека. Встречаются патогенные варианты, способные вызывать желудочно-кишечные заболевания у молодняка животных [4].

Как санитарно-показательные микроорганизмы, протеи вместе с бактериями группы кишечной палочки, энтерококками, сульфитредуцирующими клостридиями, колифагами применяются для санитарно-гигиенической оценки кормов для животных, почвы, воды открытых водоемов [5].

Нормативный документ «Методика индикации бактерий рода «Протеус» в кормах животного происхождения 1981 г.» регламентирует использование устаревших методик и питательных сред, поэтому назрела необходимость в проведении валидационных процедур для получения объективной оценки степени контаминации протеями исследуемых объектов [6]. Актуальность совершенствования методов исследования материала для выделения бактерий родов *Proteus* и *Providencia* в ветеринарной практике связана с появлением новых питательных сред, обладающих хорошими дифференциально-диагностическими и селективными свойствами.

В ветеринарных лабораториях, лабораториях мясокомбинатов, а также в диагностических лабораториях при исследовании объектов внешней среды и кормов при обнаружении протеев используется метод Шукевича с использованием свежескошенного мясопептонного агара (МПА). При наличии «ползучего» вуалеобразного роста на МПА определяют титр по наименьшему количеству засеянного материала, в котором обнаружен рост бактерий рода *Proteus* [6].

Для получения чистой культуры первичный посев исследуемого материала производят на поверхность селективных дифференциально-диагностических питательных сред. На средах Плоскирева и Эндо представители *P. vulgaris* и *P. mirabilis* могут давать вуалеобразный рост (роение). Нероящиеся представители рода протеев обычно образуют более «нежные» колонии небольших размеров. На питательной среде для выделения сальмонелл и шигелл (SS-агар) нередко обнаруживается очаговое роение протеев. Представители *P. vulgaris* на висмут-сульфит-агаре растут в виде колоний светло-зеленого цвета, что может привести к ложноположительным результатам при росте сальмонелл, не продуцирующих сероводород. Питательная среда для селективного выделения и учета всех видов энтеробактерий (агар Мосселя) подавляет роение протеев, но при этом их дифференциация от других представителей энтеробактерий затруднена из-за схожих морфологических признаков.

В последнее время появилась тенденция к использованию новых питательных сред, позволяющих выделять широ-

кий спектр энтеробактерий, принадлежащих к разным родам. Ксилозо-лизиновый дезоксихолатный агар (XLD-агар) обеспечивает дифференциацию протеев от эшерихий, сальмонелл, шигелл и других представителей энтеробактерий [7–11].

Тем не менее в ветеринарных лабораториях при выделении бактерий родов *Proteus* и *Providencia* из кормов для животных удобнее использовать высокоселективные питательные среды, позволяющие выявить на ранних стадиях наличие монокультуры в пробе и оценить ее относительное количество.

Применение валидационных процессов позволит выбрать из общего числа современных питательных бульонов (накопительных) и плотных питательных сред те варианты, которые будут предпочтительнее при низкой нагруженности патогеном образцов.

Цель исследования – сравнительная оценка ростовых свойств питательных сред и валидация методов по выделению бактерий родов *Proteus* и *Providencia* из искусственно контаминированных кормов и кормовых ингредиентов.

Материалы и методы

В работе использовались питательные среды:

селективные накопительные бульоны

- селективная питательная среда с маннитом, желчью и полимиксином для выявления бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* (ФБУН ГНЦ ПМБ),
- селективная среда для определения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* (НПЦ «Биокомпас-С»);

плотные питательные среды

- дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*» (ФБУН ГНЦ ПМБ);
- дифференциально-диагностический агар (НПЦ «Биокомпас-С»);
- МПА (ФБУН ГНЦ ПМБ) (для посева по методу Шукевича);
- триптон-соевый агар (ТСА) (ФБУН ГНЦ ПМБ) (для контроля посевной дозы нецелевых штаммов);
- питательная среда для выделения и дифференциации патогенных энтеробактерий (XLD-агар) (ФБУН ГНЦ ПМБ) (в качестве среды сравнения и при подсчете целевых штаммов).

В сравнительных исследованиях учитывались чувствительность, дифференцирующие и ингибирующие свойства питательных сред.

В процессе валидационных мероприятий оценивали следующие критерии: специфичность, повторяемость, устойчивость (определение при температурах культивирования 36°C; 36,5°C; 37°C; 37,5°C; 38°C), предел обнаружения, промежуточная прецизионность метода с использованием селективного обогащения.

Для оценки ростовых свойств питательных сред и валидационных мероприятий были использованы целевые штаммы – изоляты бактерий рода *Proteus* (*P. mirabilis*, *P. vulgaris*) и *Providencia rettgeri*, выделенные из кормов для животных.

Для проведения валидации метода готовили 45 проб матрицы (премикс, мука мясокостная), зараженных *P. mirabilis*, *P. vulgaris* и *P. rettgeri* в количестве 1–10, 10–100 и 100–1000,

1000–10000 КОЕ и 6 проб матрицы (премикс, мука мясокостная и сухой корм для непродуктивных животных), зараженной нецелевыми штаммами: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922 DSM 1103, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* ATCC 13076 DSM 17420 в количестве 10^4 КОЕ. Нецелевые штаммы получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск).

Суспензии готовили в 0,9%-м растворе хлорида натрия в концентрации, соответствующей 10 единицам по стандартному образцу мутности (СОС 42-28-59-86П), соответствующего года выпуска (ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ). Для получения суспензии с нужной концентрацией тестового микроорганизма выполняли серийные разведения полученной стандартной суспензии методом десятикратных разведений [12, 13].

Стерильные пробы матрицы массой 10 и 50 г контаминировали целевыми штаммами, используя разведения 10^{-8} ($1-10$ КОЕ), 10^{-7} ($10-100$ КОЕ), 10^{-6} (10^2-10^3 КОЕ) в 1 мл и нецелевыми штаммами, используя разведения 10^{-4} (10^4-10^5 КОЕ) в 1 мл. Суспензию вносили при комнатной температуре, ее масса (объем) соответствовала величине норматива при соотношении навески продукта и физиологического раствора 1:9.

Для биохимического подтверждения принадлежности выделенных колоний к бактериям родов *Proteus* и *Providencia* использовали альтернативные (коммерческие) наборы для видовой идентификации API 20E.

Результаты и обсуждение

Стерильные пробы матриц, контаминированные целевыми и нецелевыми штаммами в соответствующих разведениях, выдерживали при комнатной температуре 4 ч. Из исходного разведения корма высевали по 0,5 мл в 4,5 мл накопительных бульонов и в конденсационную воду со свежескошенным питательным агаром. Посевы инкубировали при $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Предварительный учет результатов проводили через 24 ч, окончательный – через 48 ч инкубации.

Положительными считали пробирки, в которых наблюдалось помутнение и/или изменение цвета среды. Селективная питательная среда с маннитом, желчью и полимиксином для выявления бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* показала преимущество, так как при росте уреазоположительных бактерий, расщепляющих мочевины, наблюдалось изменение цвета среды в синий (рисунок).

Для подтверждения присутствия бактерий родов *Proteus* и/или *Providencia* из всех пробирок, в которых наблюдалось помутнение среды и/или изменение цвета, делали пересевы на каждую плотную дифференциально-диагностическую среду таким образом, чтобы получить рост изолированных колоний. Инкубировали посевы при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 20 ч.

Отмечали подозрительные колонии на принадлежность к родам *Proteus* и *Providencia* с каждой чашки. Выбирали для идентификации не менее 3 подозрительных колоний с дифференциально-диагностических сред со следующими признаками роста: гладкие, полупрозрачные колонии розового

цвета, предположительно относящиеся к бактериям рода *Providencia*, полупрозрачные желтоватые колонии со слабым пожелтением среды, предположительно относящиеся к бактериям вида *P. vulgaris*, и гладкие, полупрозрачные, с темным центром, предположительно относящиеся к бактериям вида *P. mirabilis*.

На питательной среде XLD-агар были отмечены колонии разной морфологии: ярко-желтые непрозрачные колонии, предположительно относящиеся к эшерихиям; бесцветные колонии с неярко-выраженным темным центром, предположительно относящиеся к протеем; блестящие, бесцветные с черным центром, предположительно относящиеся к сальмонеллам.

В дальнейшем проводили биохимическую типизацию выделенных колоний со всех плотных питательных сред с использованием коммерческих наборов для видовой идентификации API 20E.

Таким образом, с помощью питательных сред «Дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*» и «Дифференциально-диагностический агар» были выделены бактерии родов *Proteus* и *Providencia*, а система индикации сероводорода, присутствующая в составе этих сред, позволила дифференцировать изоляты между собой по почернению колоний. Обе среды показали хорошие ингибирующие свойства по отношению к нецелевым штаммам: рост штаммов *E. coli*, *S. Enteritidis*, *E. faecalis* и *B. cereus* отсутствовал.

XLD-агар по ростовым свойствам показал сравнимые результаты с вышеуказанными питательными средами, но, поскольку он является средой, обеспечивающей рост не только протеев, но и других представителей энтеробактерий, его использование в ветлабораториях при выделении протеев нецелесообразно, особенно при исследовании материала, высококонтаминированного сопутствующей микрофлорой.

На следующем этапе исследований были проведены валидационные мероприятия, в ходе которых с использовани-

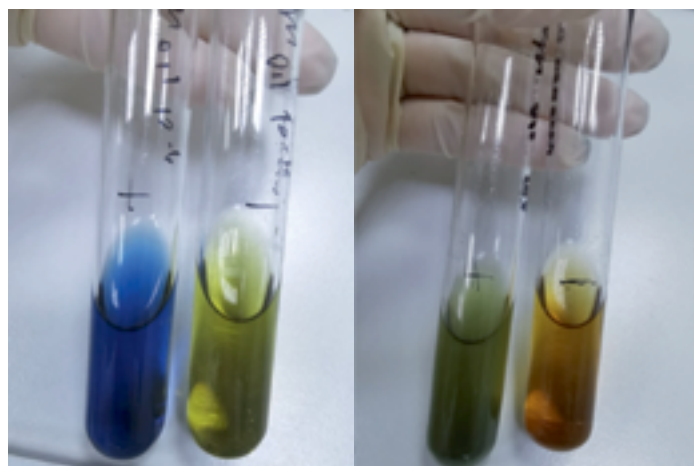


Рисунок. Рост бактерий на селективных средах: слева – селективная питательная среда с маннитом, желчью и полимиксином для выявления бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* (ФБУН ГНЦ ПМБ); справа – селективная среда для определения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* (НПЦ «Биокомпас-С»).

Таблица 1. Результаты валидационных мероприятий по определению предела обнаружения в кормах бактерий родов *Proteus* и *Providencia* при использовании селективных накопительных бульонов

Наименование питательной среды	Разведение (кол-во КОЕ в 10/50 г корма)			
	10 ⁻⁵ 1000 КОЕ	10 ⁻⁶ 100–1000 КОЕ	10 ⁻⁷ 10–100 КОЕ	10 ⁻⁸ 1–10 КОЕ
<i>Proteus mirabilis</i>				
Селективная питательная среда с маннитом, желчью и полимиксином для выявления бактерий родов <i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> , <i>Providencia</i>	+/+	+/+	+/+	-/-
Селективная среда для определения бактерий родов <i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> , <i>Providencia</i>	+/+	+/+	+/+	-/-
МПА по Шукевичу	+/+	+/+	-/-	-/-
Контроль посевной дозы на XLD-агаре	Более 300	201	19	2
<i>Proteus vulgaris</i>				
Селективная питательная среда с маннитом, желчью и полимиксином для выявления бактерий родов <i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> , <i>Providencia</i>	+/+	+/+	+/+	-/-
Селективная среда для определения бактерий родов <i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> , <i>Providencia</i>	+/+	+/+	+/-	-/-
МПА по Шукевичу	+/+	+/+	-/-	-/-
Контроль посевной дозы на XLD-агаре	Более 300	173	16	1
<i>Providencia rettgeri</i>				
Селективная питательная среда с маннитом, желчью и полимиксином для выявления бактерий родов <i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> , <i>Providencia</i>	+	+	+	-
Селективная среда для определения бактерий родов <i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> , <i>Providencia</i>	+	+	+	-
МПА по Шукевичу	+	+	-	-
Контроль посевной дозы на XLD-агаре	Более 300	120	11	1

«+» – наличие роста; «-» – отсутствие роста.

Таблица 2. Результаты валидационных мероприятий по определению специфичности метода обнаружения в кормах бактерий родов *Proteus* и *Providencia* при использовании накопительных питательных сред

Наименование питательной среды	Разведение (кол-во КОЕ в 10 г корма)						
	10 ⁻⁴ <i>P. rettgeri</i>	10 ⁻⁴ <i>P. vulgaris</i>	10 ⁻⁴ <i>P. mirabilis</i>	10 ⁻⁴ <i>E. faecalis</i>	10 ⁻⁴ <i>S. Enteritidis</i>	10 ⁻⁴ <i>E. coli</i>	10 ⁻⁴ <i>B. cereus</i>
Селективная питательная среда с маннитом, желчью и полимиксином для выявления бактерий родов <i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> , <i>Providencia</i>	+	+	+	-	-	-	-
Селективная среда для определения бактерий родов <i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> , <i>Providencia</i>	+	+	+	-	-	-	-
МПА по Шукевичу	+	+	+	-	+	+	+
XLD-агар	Более 1000	Более 1000	Более 1000	-	+	-	-
Контроль посевной дозы на TCA	Сливной рост	роение	роение	85	78	95	110

«+» – наличие роста; «-» – отсутствие роста.

ем селективных накопительных бульонов оценивались следующие параметры: специфичность, повторяемость, устойчивость, предел обнаружения и промежуточная прецизионность.

Результаты валидационных испытаний представлены в табл. 1–3.

Из табл. 1 видно, что метод Шукевича (с использованием свежескошенного МПА) по пределу обнаружения уступает методу селективного обогащения. Предел метода обнаружения бактерий родов *Proteus* и *Providencia* с использованием селективных накопительных бульонов составил 10⁻⁷ (10–100 КОЕ), метода Шукевича – 10⁻⁶ (100–1000 КОЕ).

Оценка специфичности метода обнаружения бактерий родов *Proteus* и *Providencia* в кормах для животных представлена в табл. 2.

При оценке специфичности метода было установлено, что целевые микроорганизмы – бактерии родов *Proteus* и *Providencia* – определены с требуемым уровнем правильности и прецизионности, штаммы-ассоцианты (*E. faecalis*, *S. Enteritidis*, *E. coli*, *B. cereus*), присутствующие в образце, не оказывают влияния на результат определения.

Метод Шукевича предполагает использование МПА, обеспечивающего рост разных групп микроорганизмов, это, в свою очередь, требует проведения дополнительных идентификационных тестов.

Результаты по валидационным мероприятиям представлены в табл. 3.

По результатам валидационных мероприятий показано, что изменение условий инкубации посевов не влияет на процент обнаружения микроорганизмов, составляющий 100%

Таблица 3. Результаты валидационных мероприятий метода обнаружения бактерий родов *Proteus* и *Providencia* в кормах с использованием селективных накопительных сред

Параметры валидации	Контролируемые показатели	Установленные значения
Специфичность	Исследование 6 проб матрицы, зараженных <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> в количестве 1000 КОЕ. Исследование 6 проб матрицы, зараженной <i>E. coli</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>B. cereus</i> и <i>E. faecalis</i> в количестве 10000 КОЕ	Обнаружение бактерий родов <i>Proteus</i> и <i>Providencia</i> в 100% проб, контаминированных <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> . Отсутствие бактерий родов <i>Proteus</i> и <i>Providencia</i> в 100% проб, контаминированных бактериями родов <i>E. coli</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>B. cereus</i>
Повторяемость	Исследование 45 проб матрицы, зараженных <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , в условиях повторяемости (на идентичном испытательном материале, с использованием одного и того же метода, одним оператором, на одном и том же оборудовании)	Обнаружение бактерий родов <i>Proteus</i> и <i>Providencia</i> в 100% проб
Устойчивость	Исследование матрицы, зараженной <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> (1000 КОЕ), по 6 проб при температурах инкубации: селективное обогащение и подтверждение – 36°C; 36,5°C; 37°C; 37,5°C; 38°C	Обнаружение бактерий родов <i>Proteus</i> и <i>Providencia</i> в 100% проб в установленных пределах температуры инкубации
Предел обнаружения	Исследование матрицы, зараженной <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> в количестве 10–100, 100–1000, 1000–10000, 10000–100000 КОЕ	Обнаружение бактерий родов <i>Proteus</i> и <i>Providencia</i> в 96% проб
Промежуточная прецизионность	Определение степени близости результатов обнаружения бактерий родов <i>Proteus</i> и <i>Providencia</i> в условиях промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности	Обнаружение бактерий родов <i>Proteus</i> и <i>Providencia</i> в 100% дублирующих проб

для образцов, инокулированных микроорганизмами в количестве 1000 КОЕ, что подтверждает пригодность методики по параметру «устойчивость».

Экспериментальные исследования по критериям «повторяемость» и «промежуточная прецизионность», проведенные в рамках валидации метода обнаружения бактерий родов *Proteus* и *Providencia* в кормах с использованием селективного метода обогащения, не выявили отклонений полученных результатов от установленных критериев приемлемости.

Заключение

Сравнительная оценка качества накопительных питательных сред по биологическим показателям на изолятах, выделенных из кормов для животных, показала преимущество селективной питательной среды с маннитом, желчью и полимиксином для выявления бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* (ФБУН ГНЦ ПМБ) в сравнении с селективной средой для определения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* (НПЦ «Биокомпас-С»), при использовании которой возникало затруднение при визуальной интерпретации результатов.

Исследования показали, что плотные дифференциально-диагностические питательные среды для выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* имели сравнимые результаты по дифференцирующим и селективным свойствам. Их применение позволило в предварительном фенотипическом тесте дифференцировать изоляты протеев по способности образовывать сероводород.

Результаты валидационных мероприятий позволили установить, что комплексное использование дифференциально-диагностических и селективных отечественных питательных сред для накопления и выделения бактерий родов *Proteus*, *Morganella* и *Providencia* значительно повысит эффективность исследований по сравнению с существующими методами, используемыми в ветеринарной практике.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора и ФГБУ ВНИИЗЖ.

Financial support

The work was carried out within the framework of the branch program of Rospotrebnadzor and FGBI ARRIAH.

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. Кремлева АА, Скоморова ЮА, Полосенко ОВ, Шепелин АП. Пути решения проблем выделения протеев в ветеринарии. Бактериология. 2020;5(4):25-9. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-4-25-29
2. Поздеев ОК, Фёдоров РВ. Энтеробактерии: Руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007, 720 с.
3. Васильев ДА, Феоктистова НА, Золотухин СН. Выделение и изучение биологических свойств бактерий рода *Proteus*. Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2017;2(38):70-5.
4. Барт НГ, Золотухин СН, Васильев ДА. Характеристика бактериофагов рода *Providencia*. Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы VI Международной научно-практической конференции. 2015 г. Ульяновск: УГСХА им. П.А.Столыпина; 2015;(3):62-4.
5. Литусов НВ, Сергеев АГ, Григорьева ЮВ, Ишутинова ВГ. Микрофлора окружающей среды и тела человека. Учебное пособие. 2008, 28 с.
6. Методика. Индикация бактерий рода «Протеус» в кормах животного происхождения. 1981 г. (Дата актуализации 01.01.2019) утв. Главным управлением ветеринарии МСХ СССР.
7. Шепелин АП, Полосенко ОВ, Марчихина ИИ, Шолохова ЛП, Ажермачева НИ, Ершова МГ, Полетаева 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

8. Полосенко ОВ, Шепелин АП. Современные питательные среды для выделения бактерий рода *Proteus* и *Klebsiella*. Проблемы медицинской микологии. 2020;22(3):118.
9. Шепелин, АП, Полосенко ОВ. Сравнительный анализ питательных сред для выделения протеев. Бактериология. 2019;3(4):31-7. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-3-31-37
10. Микробиологический контроль качества пищевой продукции. Коллективная монография. Под ред. Поповой АЮ, Дятлова ИА. М.: Издательство «Династия»; 2020, с. 198-225.
11. Мартовецкий МН, Шепелин АП, Марчихина ИИ, Шолохова ЛП, Полосенко ОВ. Разработка питательных сред для выделения протеев и клебсиелл. Инфекция и иммунитет. 2016;3(6):66.
12. Методические указания. МУК 4.2.2316-08 Методы контроля бактериологических питательных сред» М.: Стандартиформ; 2008, 62 с.
13. ГОСТ ISO 11133-2016 Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред. М.: Стандартиформ; 2016, 98 с.

References

5. Litusov NV, Sergeev AG, Grigorieva YuV, Ishutinova VG. Microflora of the environment and the human body. 2008, 28 p. (In Russian).
6. Methodology. Indications of bacteria of the genus *Proteus* in animal feed. 1981 (Update date 01.01.2019) approved. The Main Veterinary Department of the Ministry of Agriculture of the USSR. (In Russian).
7. 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):557-563. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-9-557-563 (In Russian).
8. Polosenko OV, Shepelin AP. Modern nutrient media for isolation of bacteria of the genus *Proteus* and *Klebsiella*. Problems of Medical Mycology. 2020;22(3):118. (In Russian).
9. Shepelin AP, Polosenko OV. Comparative analysis of nutrient media for proteus isolating. Bacteriology. 2019;3(4):31-7. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-3-31-37 (In Russian).
10. Microbiological quality control of food products. Collective monograph. Edited by Popova AYU, Dyatlov IA. Moscow: Publishing House "Dynasty"; 2020, pp. 198-225. (In Russian).
11. Martovitsky MN, Shepelin AP, Marchikhina II, Sholokhova LP, Polosenko OV. Development of nutrient media for the isolation of proteus and klebsiella. Russian Journal of Infection and Immunity. 2016;3(6):66. (In Russian).
12. Methodological guidelines. MUK 4.2.2316-08 Methods of control of bacteriological nutrient media. Moscow: Standartinform; 2008, 62 p. (In Russian).
13. GOST ISO 11133-2016 Microbiology of food, animal feed and water. Preparation, production, storage and determination of working characteristics of nutrient media. Moscow: Standartinform; 2016, 98 p. (In Russian).

Информация о соавторе:

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

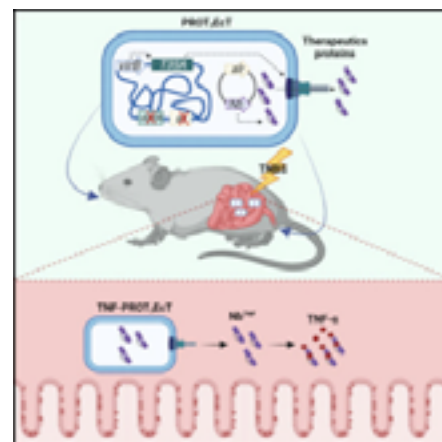
Information about co-author:

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

НОВОСТИ НАУКИ

Лекарственная платформа для направленной доставки терапевтических средств к очагам заболевания

Сообщается о разработке PROT3Ect, набора комменсальных клеток *Escherichia coli*, созданных для выделения белков непосредственно в окружающую среду. Эти бактерии состоят из трех модульных компонентов: модифицированной системы секреции бактериального белка, ассоциированного с ней регулируемого активатора транскрипции и секретируемой терапевтической полезной нагрузки. PROT3Ect секретирует функциональные однодоменные антитела, нанотела (Nbs) и стабильно колонизирует и поддерживает активную систему секреции в кишечнике мышей. Кроме того, одной профилактической дозы варианта PROT3Ect, который секретирует Nb, нейтрализующий фактор некроза опухоли- α (TNF- α), достаточно для снижения провоспалительных уровней TNF и предотвращения развития повреждения и воспаления в химически индуцированной модели колита. Эта работа закладывает основу для разработки PROT3Ect в качестве платформы для лечения желудочно-кишечных заболеваний.



Lynch JP, et al.

Engineered *Escherichia coli* for the in situ secretion of therapeutic nanobodies in the gut. *Cell Host & Microbe*. 2023;C. S1931312823001117.

Использование диоксида кремния для очистки рекомбинантных белков

Е.М.Мазурина, П.Х.Копылов, С.В.Дентовская

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

Сконструировали и очистили Ni-хелатной хроматографией модельные белки mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆ содержащие Si-метки как инструмент работы с различными видами частиц диоксида кремния, отличающимися удельными поверхностями, размерами и физико-химической природой. Изучили особенности специфического взаимодействия частиц диоксида кремния «Silica», «Силохром», «CPG-10» с модельными белками. Провели выделение модельных белков порционной хроматографией на основе полученных результатов.

Ключевые слова: рекомбинантные белки mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆, конструирование, аффинная хроматография, диоксид кремния, рибосомальный белок L2, порционная хроматография

Для цитирования: Мазурина Е.М., Копылов П.Х., Дентовская С.В. Использование диоксида кремния для очистки рекомбинантных белков. Бактериология. 2023; 8(1): 43–50. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-43-50

Affinity tags for recombinant protein purification

E.M.Mazurina, P.Kh.Kopylov, S.V.Dentovskaya

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

Model proteins mCherry-L2-His₆ and EGFP-L2-His₆ containing Si-tags were constructed and purified by Ni-chelate chromatography as a tool for working with various types of silica particles differing in specific surface area, particle size, and physicochemical nature. We studied the features of the specific interaction of particles of silicon dioxide «Silica», «Silochrome», «CPG-10» with model proteins. The model proteins were isolated by batch chromatography based on the results obtained.

Key words: recombinant proteins mCherry-L2-His₆ and EGFP-L2-His₆, construction, affinity chromatography, silicon dioxide, ribosomal protein L2, batch chromatography

For citation: Mazurina E.M., Kopylov P.Kh., Dentovskaya S.V. Affinity tags for recombinant protein purification. Bacteriology. 2023; 8(1): 43–50. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-43-50

Аффинные метки являются высокоэффективными инструментами для очистки рекомбинантных белков, позволяющими выделить практически любой из них, точно следуя инструкциям производителя. Различные белки, домены и пептиды используются в качестве аффинных меток для реализации специфического белок-доменного сродства, реализуемого в окружении обилия посторонних компонентов клеточных лизатов [1–4].

Популярность гексагистидиновой метки (His₆-tag) обусловлена ее специфическим сродством к иммобилизованным ионам переходных металлов (например, Ni²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Co²⁺ и Cu²⁺) за счет образования координационных связей [5, 6]. В качестве специфического конкурента этого

сродства выступает имидазол, который в относительно высоких концентрациях (50–600 мМ) вытесняет His₆-метку. Важным преимуществом этого метода является то, что координационные связи устойчивы в растворах солей с высокой ионной силой (2 М NaCl), а также в денатурирующих условиях (8 М мочевины). Например, глутатион-S-трансфераза и белок, связывающий мальтозу, также являются аффинными метками, но не могут использоваться в денатурирующих условиях [7, 8]. К недостаткам металлохелатного метода относится его умеренное сродство ко всем низкоаффинным гистидин-содержащим белкам клеточных лизатов, связывающимся с хелатирующей смолой. Поэтому рекомбинантные белки с низким уровнем экспрессии конкурируют с ними за

Для корреспонденции:

Мазурина Елизавета Михайловна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций 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) 36-0117

Статья поступила 14.02.2023, принята к печати 28.04.2023

For correspondence:

Elizaveta M. Mazurina, Junior Researcher of Laboratory for Plague Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0117

The article was received 14.02.2023, accepted for publication 28.04.2023

центры связывания и выделяются сильно контаминированные примесями. Практическое применение хелатирующих хроматографических носителей ограничивается не только высокой стоимостью и законодательными ограничениями их поставок, но и высокими требованиями к чистоте полученных протеинов, которые не должны нести His₆-метку [9–11]. Удаление метки и последующие этапы очистки могут существенно увеличить себестоимость конечного продукта.

Вышесказанное побуждает к постоянному поиску простых и технологичных решений. Так, недавно было показано, что белок L2 большой субъединицы рибосомы *Escherichia coli* способен прочно связываться с диоксидом кремния и его производными, несущими силанольные группы, не требуя химической модификации, предварительной обработки или каких-либо особых условий. Белки, слитые с L2, связываются с поверхностью кремнезема даже в присутствии высоких концентраций соли и детергентов. Данный тип метки, использующий рибосомальный белок L2 для иммобилизации слитых функциональных белков на поверхности кремнезема, обозначили как «Si-метка» [12]. Si-метка может быть функционально слита с любым концом целевого белка. Si-метка может являться полезной слитой меткой для ориентированной иммобилизации функциональных белков, которая обеспечивает хорошую стерическую доступность их активных центров для молекул-мишеней в растворе и усиливает взаимодействие между иммобилизованными белками и молекулами-мишенями [13]. При этом актуальными становятся вопросы, связанные с изучением взаимодействия Si-метки в составе определенных рекомбинантных белков с некоторыми доступными формами диоксида кремния.

Настоящее исследование опиралось на результаты предшествующих работ [14], демонстрирующих сильное сродство Si-метки модельных белков, содержащих в составе L2 (L2 (1–60, 203–273) и L2 (203–273)), к кремнезему, позволяющее использовать одноэтапный метод очистки.

Авторы использовали немодифицированные частицы чистого кремнезема в качестве специфического адсорбента, раствор MgCl₂ высокой концентрации в качестве элюирующего буфера и слитый белок, состоящий из Si-метки и иммуноглобулин-связывающего стафилококкового белка А, что обеспечило его быструю и экономичную очистку [11, 14].

Мы, в свою очередь сконструировали модельные белки mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆, содержащие Si-метки как

инструмент работы с различными видами частиц диоксида кремния. В нашем исследовании использовали различные формы частиц диоксида кремния, отличающиеся как удельными поверхностями, так и размерами частиц, и их физико-химической природой. Кроме того, одна из форм частиц диоксида кремния, «CPG-10», представляла собой аморфное состояние вещества, «Silica» и «Силохром» – кристаллическое. Поэтому перед нами стояла задача изучения особенностей специфического взаимодействия частиц «Silica», «Силохром», «CPG-10» с этими белками, что расширит наше понимание этих процессов.

Целью исследования – создание молекулярно-генетических конструкций и получение рекомбинантных белков, несущих в своей структуре silica-связывающий домен, как инструмент работы с различными видами частиц диоксида кремния.

Материалы и методы

Материалы

Использовали частицы диоксида кремния препаратов «Silica» («Хеликон», Россия), «Силохром» («ХромЛаб», Россия) и «CPG-10» (SERVA, Германия).

Штаммы микроорганизмов и условия культивирования

Штаммы бактерий и плазмиды, использованные в работе, представлены в табл. 1.

Штаммы *E. coli* выращивали в жидкой или на агаризованной среде LB (Luria Bertani broth medium – триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl 10 г/л), pH 7,2 [15], добавляя при необходимости ампициллин до концентрации 100 мкг/мл. Синтез белков индуцировали путем добавления изопропил-β-D-1-тиогаляктопиранозида (ИПТГ) до конечной концентрации 0,5 мМ при достижении культурами ОП₅₉₀ 6,3 ед (ОП₅₉₀ – оптическая плотность при длине волны 590 нм), культивирование после добавления ИПТГ продолжали еще 4 ч.

Праймеры, использованные в работе, представлены в табл. 2. Расчет праймеров для конструирования плазмид и анализ свойств белков проводили с использованием программы Vector NTI 10.0.1 (Invitrogen, США).

Таблица 1. Характеристика использованных в работе штаммов микроорганизмов и плазмид

Штамм или плазида	Генотип или соответствующая характеристика	Источник
<i>E. coli</i> DH5α	F-, gyrA96(Nalr), recA1, relA1, endA1, thi1, hsdR17(rk-, mk+), glnV44, deoR, Δ(lacZYA-argF)U169, [φ80dΔ(lacZ)M15], supE44	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F–ompT hsd SB (rB– mB–) gal dcm (DE3)	Novagene, Madison, WI
pEGFP-N1	Источник гена egfp	
pET-MBP-mCherry-LIC	Источник гена mcherry	New England Biolabs
pET32b (+)	Производное pBR322, f1, содержит T7 промотор, T7 терминатор, полилинкер, lacI, bla, Trx-Tag, His-таг и Si-таг домены. Экспрессирующий вектор	Novagene, Madison, WI
pET32b-L2(201-273)-Xho	Производное pET32b (+)	НИ
pET32b-EGFP-L2(201-273)-Xho	Производное pET32b (+)	НИ
pET32b-mCherry-L2(201-273)-Xho	Производное pET32b (+)	НИ

*НИ – настоящее исследование.

Конструирование плазмид

Для получения плазмиды рЕТ32b-L2(201-273)-Xho фрагмент гена белка L2 большой субъединицы рибосомы *E. coli* (аминокислотные остатки 201-273) амплифицировали с использованием праймеров L2-Xho201/L2-Sal273-N и хромосомной ДНК штамма *E. coli* DH5 α в качестве матрицы, обрабатывали рестриктазами XhoI/SalI и лигировали с плазмидой рЕТ32b (+)/XhoI-FastAP в течение ночи при температуре +11°C. Лигатом трансформировали клетки *E. coli* DH5 α . Наличие вставки L2(201-273) в нужной ориентации в трансформантах, отобранных на LB агаре с ампициллином, анализировали в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с парой праймеров L2-Xho201/pEY-6.

Гены зеленого и красного флуоресцентных белков EGFP и mCherry амплифицировали с использованием праймеров EGFP-NdeI/EGFP-N-Sal или Nde-Cher/Cher-N-Sal на матрицах плазмид рEGFP-N1 или рET-MBP-mCherry-LIC соответственно. Полученные ампликоны обрабатывали рестриктазами NdeI/SalI и лигировали с плазмидой рЕТ32b-L2(201-273)-Xho/NdeI-SalI-FastAP. Лигатом трансформировали клетки *E. coli* DH5 α . Клоны анализировали на наличие вставки в ПЦР с парами праймеров EGFP-NdeI/EGFP-N-Sal и Nde-Cher/Cher-N-Sal для EGFP и mCherry соответственно. На всех этапах правильность сборки плазмид подтверждали в рестрикционном анализе и путем секвенирования вставок с использованием праймеров T7dir и T7rev.

Полученные штаммы *E. coli* BL21(DE3)/рЕТ32b-EGFP-L2(201-273)-Xho и BL21(DE3)/рЕТ32b-mCherry-L2(201-273)-Xho использовали для продукции белков EGFP-L2(201-273)-His $_6$ и mCherry-L2(201-273)-His $_6$ соответственно.

Экспрессия рекомбинантных белков

После определения клонов с предполагаемой индукцией биосинтеза белков выращенную биомассу из 5 л культуры микробных клеток *E. coli* BL21(DE3)/рЕТ32b-mCherry-L2 и *E. coli* BL21(DE3)/рЕТ32b-EGFP-L2 отделяли центрифугированием, осадки замораживали и хранили при -20°C. Клеточную локализацию целевых белков анализировали электрофорезом проб, приготовленных из аликвот биомассы с 5×10^8 КОЕ/мл. Материал для колоночной хроматографии готовили разрушением ультразвуком и центрифугированием клеточных лизатов, содержащих белки mCherry-L2-His $_6$ и EGFP-L2-His $_6$.

Очистка белков с помощью Ni-хелатной аффинной хроматографии

Целевые белки выделяли как из осветленных центрифугированием лизатов клеток *E. coli*, так и из растворенных в 8 М мочевины телец включения на колонке XK-26 (Cytiva, ЕС), упакованной 25 мл Ni²⁺-TSK AF-Chelate Toyopearl 650 M (Tosoh, Япония), предварительно уравновешенной основным буферным раствором (10 мМ трис, рН 8,0, 5 мМ имидазола и 500 мМ NaCl). Состав буферных растворов и параметры хроматографии определяли с учетом рекомендаций производителя для денатурированных мочевиной белков. Состав элюированных фракций анализировали при помощи ДСН-ПААГ, после чего выбранные фракции объединяли и диализовали против буферного раствора (5 мМ трис, рН 6,8, 500 мМ NaCl) и центрифугировали в течение 15 мин при

Таблица 2. Праймеры, использованные для конструирования плазмид

Праймер	Последовательность (5'-3')
EGFP-NdeI	ATCATA [*] CATAT [*] GGTGAGCAAGGGCGAGG
EGFP-N-Sal	CCTGTCGACCTTTGTACAGCTCGTCCATGC
Nde-Cher	CACCTACATAT [*] GAGCAAGGGCGAGGAGGATAAC
Cher-N-Sal	TTTGTTCGACCTTTGTACAGCTCGTCCATGC
L2-Xho201	CCTCTCGAGCTGCGCGTTCTGGGTTAAAGC
L2-Sal273-N	CCTGTGCACTTTGCTACGGCGACGTACGATG
pEY-6	TCAGTGGTGGTGGTGGTGGTG
T7dir	TAATACGACTCACTATAGGG
T7rev	ATGCTAGTTATTGCTCAG

* сайты связывания эндонуклеаз рестрикции подчеркнуты.

16 000 g и при температуре 12°C. Надосадочные фракции стерильно фильтровали через полиэфирсульфоновую мембрану (Whatman, США) с диаметром пор 0,2 мкм и хранили при температуре 4°C в течение опытов по изучению свойств частиц диоксида кремния. Буферы для работы с белком EGFP-L2-His $_6$, дополняли включением 0,4% N-лауроилсаркозина для сохранения его растворимости.

Адсорбция белков на частицах диоксида кремния

Насыщающие концентрации белков mCherry-L2-His $_6$ и EGFP-L2-His $_6$ в отношении различных частиц диоксида кремния определяли в течение их двухчасовой инкубации при комнатной температуре. Для подавления неспецифического связывания в связывающие буферные растворы добавляли детергенты – 0,4% N-лауроилсаркозин или твин-20. Оптимальные значения рН для связывания белков и диоксида кремния определяли по времени инкубации в буферной системе, представленной 50 мМ цитрат-фосфатным буфером в широком интервале рН: 5,0, 6,0 и 7,0, а также 50 мМ трис-буфером, рН 6,8. Отбор проб объемом 0,18 мл из общего реактора содержащего 1,8 мл реакционной смеси, производили в интервале времени от 50 с, в момент введения белка в реакционную смесь, до 120 мин. В течение реакции суспензию постоянно перемешивали. Отобранные пробы немедленно центрифугировали при 14 000 об./мин в течение 20 с и готовили пробы для электрофореза из 0,03 мл осветленного центрифугата.

Освобождение белков с частиц диоксида кремния

Препараты суспензий частиц диоксида кремния, насыщенные сорбированными белками mCherry-L2-His $_6$ и EGFP-L2-His $_6$, объемом по 0,18 мл инкубировали отдельно с 0,1 мл 2 М растворов CaCl $_2$, MgCl $_2$, MnCl $_2$ или 0,5 М аргинина при периодическом перемешивании в течение 2 ч при комнатной температуре. Частицы отделяли центрифугированием и отбирали для обессоливания пробы по 0,05 мл из каждой надосадочной фракции. Обессоливание проводили на микроколонках BioToolomics (ЕС) либо микродиализом с последующим осаждением анализируемых белков ТХУ (ТХУ – трихлоруксусная кислота). Осадки растворяли в 0,1 мл буфера Laemmli и использовали для электрофоретического анализа.

Таблица 3. Расчетные характеристики рекомбинантных белков

Характеристика	EGFP-L2(201-273)-His ₆	mCherry-L2(201-273)-His ₆
Длина	328 а.о.	324 а.о.
Молекулярная масса	36895,44	36576,85
1 мг	27,104 пМоль	27,340 пМоль
Молярный коэффициент экстинкции	31390	43810
1 ОЕ A[280] соответствует	1,18 мг/мл	0,83 мг/мл
A[280] 1 мг/мл	0,85 AU	1,20 AU
Изоэлектрическая точка	9,04	9,26
Заряд при pH 7,0	7,35	9,12

Порционная хроматография белков на частицах диоксида кремния

Суспензии сорбентов «Silica», «Силохром» и «CPG-10» объемом 2 мл суспендировали в центрифужных стаканах в 10-кратном избытке буферов, содержащих 10 мМ трис (pH 6,8), 500 мМ NaCl, 0,2% твина-20, и отмывали центрифугированием в течение 5 мин при 8000 g и температуре 20°C три раза. Буферный раствор для выделения белка EGFP-L2-His6 дополняли 6 М мочевиной. Влажные осадки суспендировали с осветленными клеточными лизатами и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Несвязавшиеся белки отмывали, а влажные осадки частиц диоксида кремния суспендировали в 2 мл буфера Laemmli и прогревали при температуре 95°C в течение 5 мин. Элюаты анализировали ДСН-ПААГ.

Результаты и обсуждение

Конструирование плазмид

Плазмиду pET32b-L2(201-273)-Xho сконструировали в результате клонирования гена l2(201-273) в сайт XhoI плазмиды pET32b (+) (рис. 1).

В результате клонирования генов egfp и mcherry по сайтам рестрикции NdeI и Sall в плазмиде pET32b-L2(201-273)-Xho получили плазмиды pET32b-EGFP-L2(201-273)-Xho и pET32b-mCherry-L2(201-273)-Xho (рис. 2).

Гены l2(201-273), egfp и mcherry были амплифицированы без стоп-кодонов, что позволило получить слитые генетические конструкции egfp-l2(201-273) и mcherry-l2(201-273), кодирующие белки EGFP-L2(201-273)-His6 и mCherry-L2(201-273)-His6. Гексагистидиновая последовательность на С-конце

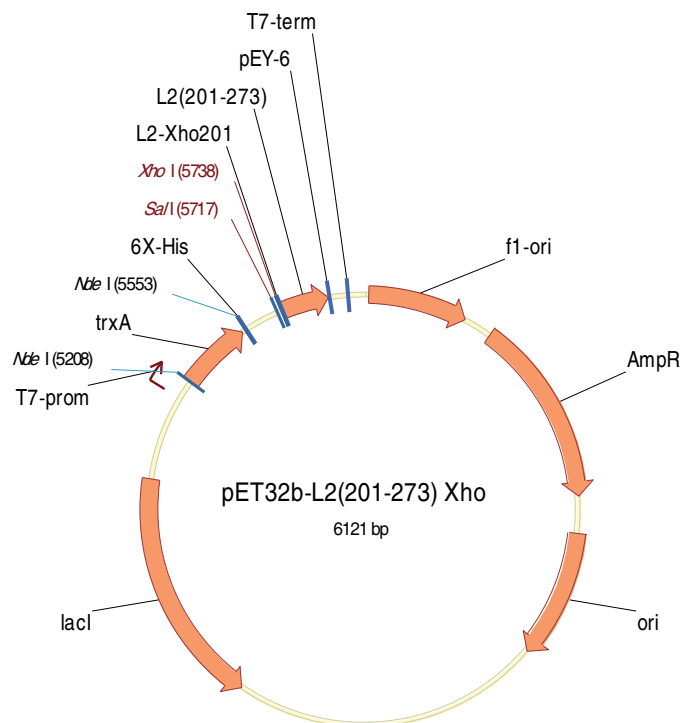


Рис. 1. Карта плазмиды pET32b-L2(201-273)-Xho.

белков, кодируемая плазмидой pET32b (+), позволяет использовать металло-хелатную хроматографию для выделения и изучения их свойств.

Свойства белков EGFP-L2(201-273)-His6 и mCherry-L2(201-273)-His6, рассчитанные с использованием программы Vector NTI 10.0.1 (Invitrogen, США), представлены в табл. 3.

Экспрессия рекомбинантных белков

Культивирование штаммов E. coli BL21(DE3)/pET32b-mCherry-L2 Xho #1.1 и E. coli BL21(DE3)/pET32b-EGFP-L2 Xho #4.1 проводили в шести качалочных колбах, содержащих по 300 мл среды. К моменту внесения индуктора ОП продуцента белка mCherry-L2-His6 достигла 6,9 ед, а продуцента белка EGFP-L2-His6 – 6,3 ед, через 4 ч индукции ОП культур изменились до 8,0 ед и до 5,8 ед. соответственно, а вес осадков оказался примерно равным, по 15 г.

Анализ клонов и фракций лизированной биомассы продемонстрировал посредственный уровень экспрессии целевых белков, подтвержденный отсутствием выраженных полос новосинтезированных белков на электрофореграммах (рис. 3, линии 1, 2, 4, 12), поэтому для Ni-хелатной хро-

Таблица 4. Основные характеристики препаратов диоксида кремния и их связывающие способности в отношении белков mCherry-L2-His6 и EGFP-L2-His6

Показатель	«Silica» Helicon	«Силохром» С-120	«CPG-10» SERVA
Внешний вид	Порошок белого цвета с кремовым оттенком	Порошок белого цвета, зерна нерегулярной формы	Порошок белого цвета, сыпучий
Грануляция, мм	0,0005–0,01	0,315–0,500	0,178–0,125
Средний диаметр пор, нм	2–5	20–30	8,4
Удельная поверхность, м²/г	464	100–140	215
Сорбция альбумина (БСА), мкг/мг	0,000	0,000	0,000
Сорбция белка mCherry-L2-His6, мкг/мг	0,037	0,017	0,014
Сорбция белка EGFP-L2-His6, мкг/мг	0,006	0,006	0,005

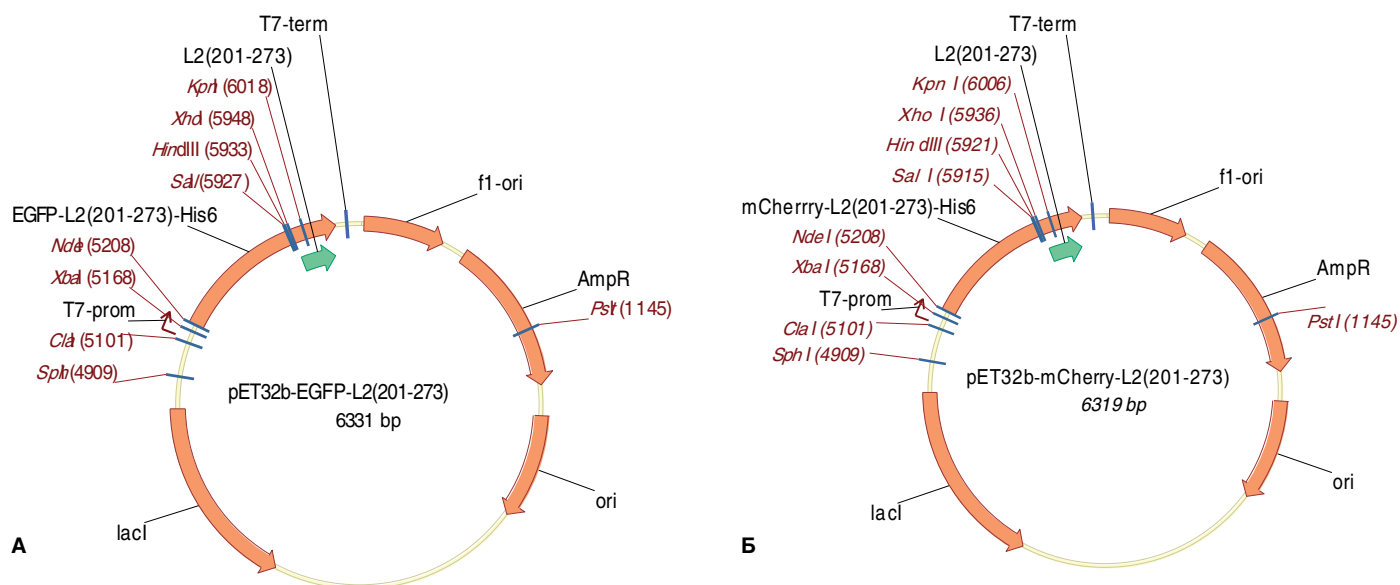


Рис. 2. Карты плазмиды pET32b-EGFP-L2(201-273)-Xho (А) и pET32b-mCherry-L2(201-273)-Xho (Б).

матогамии использовали как надосадочные части лизатов микробных клеток, так и фракции осадков, растворенных в 8 М мочеvine.

Очистка рекомбинантных белков аффинной Ni-хелатной хроматографией

Оба рекомбинантных полипептида, несущие в своей структуре Si-связывающий домен и His₆ последовательность получали в очищенном виде на колонках с Ni-хелатным носителем. При хроматографии растворимого материала практически весь белок mCherry-L2-His₆ элюировали 60 мМ имидазолом, увеличение концентрации имидазола до 600 мМ приносило фракции содержащие следовые количества белка с заметными примесями протеолитических фрагментов с молекулярной массой около 14 кДа (рис. 3, линии 6, 7). Полученные в таких же условиях растворимые фракции EGFP-L2-His₆ целевого белка не содержали (рис. 3, линии 14, 15). Аффинная хроматография белков, растворенных из осадков 8 М мочеvine, показала значительное наличие очищенного полипептида mCherry-L2-His₆ во фракциях элюированных 20 мМ и 300 мМ имидазолом в присутствии 6 М мочеvine (рис. 3, линии 10, 11). Белок EGFP-L2-His₆ элюировали только буфером, содержащим 300 мМ имидазол и 6 М мочеvine, его содержание в этих фракциях превышало 95 % (рис. 3, линии 19, 20). Диализ хроматографических фракций с EGFP-L2-His₆, содержащих 6 М мочеvine против ФСБ (ФСБ – фосфатно-солевой буфер) приводил к полному осаждению белка. В последующих экспериментах ФСБ дополняли детергентами различной природы: NP-40, додецилсульфатом натрия, сульфобетаином и N-лауроилсаркозином, определили, что белок EGFP-L2-His₆ сохранял растворимость в 0,2% растворе N-лауроилсаркозина.

Связывание белков mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆ с частицами препаратов диоксида кремния

Использовали коммерческие препараты диоксида кремния с близкими значениями удельной поверхности, основные характеристики которых предоставлены производителями (табл. 4). Оценку неспецифической адсорбции пред-

варительно проводили с бычьим сывороточным альбумином в качестве модельного белка, не несущего Si-связывающих доменов. По аналогии с иммуноферментным анализом (ИФА) все буферные растворы содержали 0,2% твин-20 или 0,4% N-лауроилсаркозин. Было показано, что детергенты блокировали неспецифическое связывание БСА (бычий сывороточный альбумин) с частицами диоксида кремния, поэтому их включали в состав рабочих буферных растворов в опытах с очищенными клонированными белками и частицами.

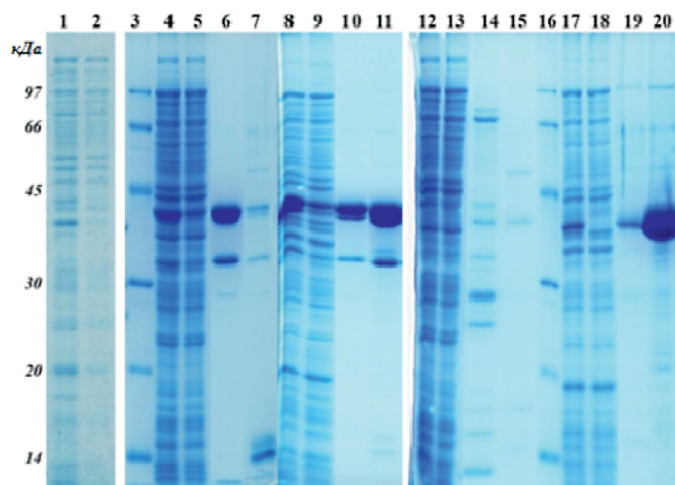


Рис. 3. Выделение белков mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆ аффинной Ni-хелатной хроматографией из надосадочных фракций и растворенных осадков лизированных биомасс.

Линии: 1, 2 – цельноклеточные лизаты клонов; 4, 5, 6, 7, 12, 13, 14, 15 – надосадочные фракции биомасс; 8, 9, 10, 11, 17, 18, 19, 20 – осадки биомасс, растворенные в 8 М мочеvine; 4, 8, 12, 17 – фракции, нагруженные на колонку; 5, 9, 13, 18 – фракции белков, не связавшиеся с хелатирующим носителем колонки; 6, 14 – белки элюированные 60 мМ имидазолом; 7, 15 – белки, элюированные 600 мМ имидазолом; 10, 19 – белки, элюированные 20 мМ имидазолом в присутствии 6 М мочеvine; 11, 20 – белки, элюированные 300 мМ имидазолом в присутствии 6 М мочеvine; 3, 16 – маркеры молекулярных масс «LMW» Cytiva обозначены числами слева от геля; 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 – штамм *E. coli* BL21(DE3)/pET32b-mCherry-L2 Xho #1.1; 2, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 – штамм *E. coli* BL21(DE3)/pET32b-EGFP-L2 Xho #4.1.

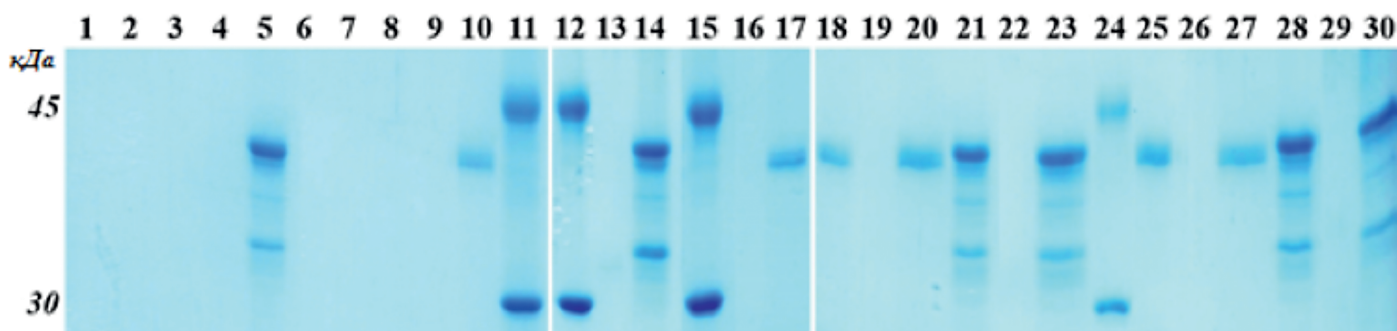


Рис. 4. Освобождение белков mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆ с различных частиц диоксида кремния двухвалентными ионами, денатурирующими агентами и детергентами.

Линии: 1–17 – частицы препарата «Silica»; 18–23 – «Силохром» С-120; 25–30 – «СРG-10»; 1, 2, 3, 4, 13, 14, 25, 26, 27, 28, 29, 30 – белок mCherry-L2-His₆; 6, 7, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 – белок EGFP-L2-His₆; 1, 6, 19, 22, 26, 29 – 2М CaCl₂; 2, 7 – 0,5М аргинин; 3, 8 – 8 М мочевины; 4, 9 – 7 М гуанидин хлорид; 14, 17, 20, 23, 27, 30 – 0,1% ДСН; 5, 10, 18, 21, 25, 28 – пробы, не содержащие частиц препаратов; 11, 12, 15, 24 – маркеры молекулярных масс «LMW» Cytiva обозначены курсивом справа от геля.

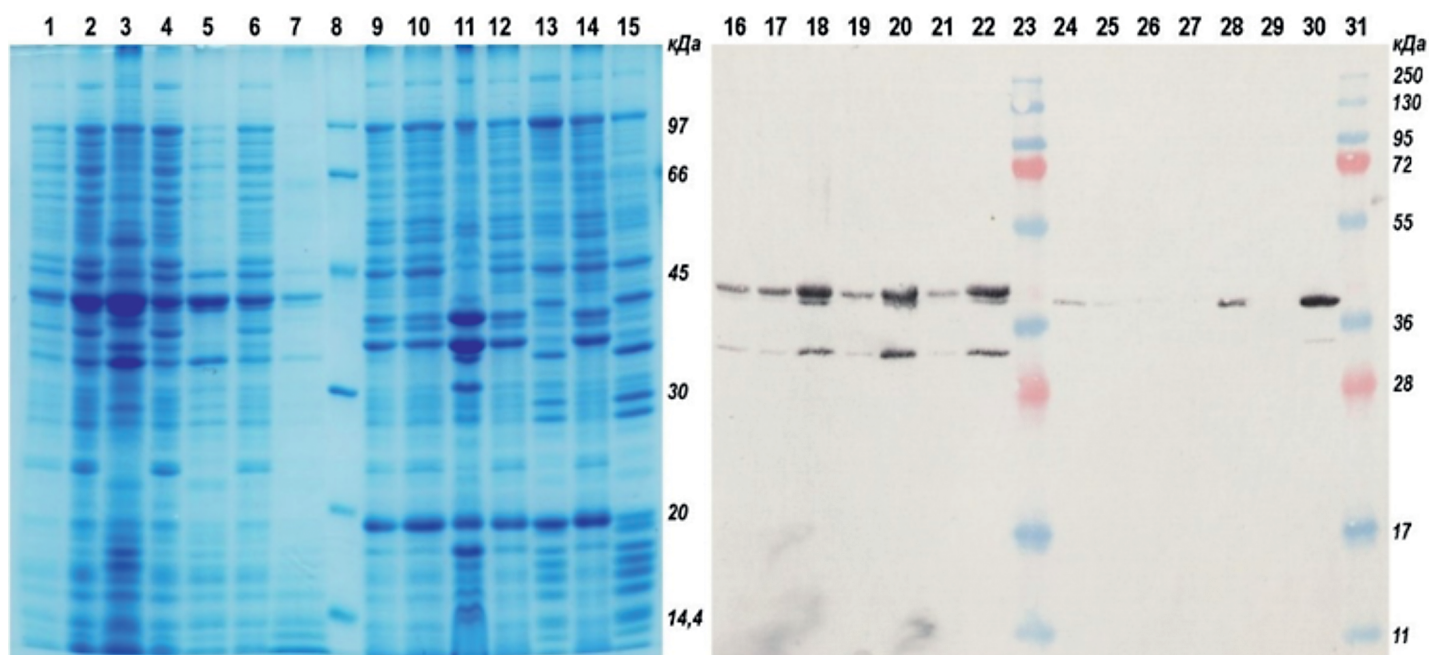


Рис. 5. Электрофорез и вестерн-блот белков mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆, выделенных порционной хроматографией.

Линии: 1–7, 16–22 – белок mCherry-L2-His₆; 9–15, 24–30 – белок EGFP-L2-His₆; 8 – маркеры молекулярных масс LMW; 23, 31 – маркеры молекулярных масс Sm1811; 2, 3, 10, 11, 17, 18, 25, 26 – «Silica»; 4, 5, 12, 13, 19, 20, 27, 28 – «Силохром» С-120; 6, 7, 14, 15, 21, 22, 29, 30 – «СРG-10»; 1, 16 – исходный клеточный лизат mCherry-L2-His₆; 9, 24 – осадок белка EGFP-L2-His₆, растворенный в 6 М мочевины; 2, 4, 6, 10, 12, 14 – просоки; 3, 5, 7, 11, 13, 15 – элюаты.

В экспериментах оперировали объемами суспензий диоксида кремния, в 0,1 мл которых содержалось 8,6 мг «Silica», 6,0 мг «Силохрома» или 10,8 мг «СРG-10». Результаты всех экспериментов приводили к сухому весу частиц. Эксперименты проводили таким образом, чтобы временные и концентрационные соотношения компонентов реакционной смеси не ограничивали полное связывание белков [11, 14, 16]. Диапазон рН при изучении связывания рекомбинантных белков имел ограничения, связанные с растворимостью диоксида кремния в щелочной области рН, но существенных различий адсорбционных свойств в диапазоне рН от 5,0 до 7,0 обнаружено не было. Отмечали высокую скорость связывания обоих белков, которые полностью поглощались суспензиями различных форм диоксида кремния менее чем за 1 мин. Связывание белков оценивали по уменьшению их количества в пробах надосадочной части реакционных сме-

сей методом ДСН-ПААГ. Экспериментами было установлено, что наибольшую связывающую способность в отношении белка mCherry-L2-His₆ проявил препарат «Silica», обладающий самой развитой величиной удельной поверхности. Кристаллы «Силохрома» С-120 и «СРG-10» сорбировали вдвое меньше mCherry-L2-His₆, что пропорционально значениям их удельной поверхности в условиях полного насыщения белком (табл. 4). Белок EGFP-L2-His₆ сорбировался различными формами диоксида кремния в одинаковой степени, несмотря на различия их удельных поверхностей. Было показано, что даже при существенном избытке кристаллов около 5% белка с ними не связывалось и оставалось в растворе. То есть, часть молекул белка EGFP-L2-His₆ получала структуру, препятствующую проявлению свойств Si-связывающего домена, возникшую в результате ренатурации при диализе, хотя и оставалась в растворимой форме

за счет N-лауроилсаркозина. По сравнению с гомоморфными молекулами альбумина и белка mCherry-L2-His₆ возникшие множественные ренатурированные формы белка EGFP-L2-His₆ обладали различным сродством к диоксиду кремния, что, вероятно, и привело к усреднению показателя адсорбции (табл. 4).

Элюция белков mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆ с частиц препаратов диоксида кремния

Условия, при которых происходит элюция модельных белков с диоксида кремния, определяются тем, что в водных растворах поверхность оксида кремния представлена в гидратированной форме силанольными группами (-SiOH). При нейтральных значениях pH они диссоциируют и образуют общую отрицательно заряженную поверхность, которая действует как катионообменник [17]. Белки mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆, обладая изоэлектрическими точками соответственно 9,26 и 9,04, электростатически притягиваются к силанольным поверхностям и могут освободиться, например, двувалентными катионами в высоких концентрациях. Однако использованные нами 2 М растворы солей двувалентных металлов Ca²⁺, Mg²⁺ и аминокислота аргинин (0,5 М) принесли отрицательные результаты. Перед электрофоретическим анализом элюаты были обессолены при помощи микроколонок или микродиализом с последующим концентрированием 80%-м раствором ТХУ. Обнаружить белки mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆ в этих образцах не удалось. Использование денатурирующих и хаотропных агентов (8 М мочевины и 7 М хлористого гуанидина) также не принесло результатов. Однако при более жесткой обработке 0,1%-м раствором ДСН (ДСН – додецилсульфат натрия) в течение 5 мин и 95°C наблюдали практически полное освобождение белков mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆ от частиц «Silica» (рис. 4). Расчеты показали, что метод кипячения суспензий двуокиси кремния с раствором 0,1% ДСН освобождал (92 ± 5)% сорбированных белков mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆.

Порционная хроматография белков mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆ на частицах диоксида кремния

Препараты двуокиси кремния «Силохром» С-120, «CPG-10» и «Silica», использованные в настоящем исследовании, обладали различными характеристиками (табл. 4), вследствие гетерогенности размеров часть частиц не удерживалась колоночными фильтрами, поэтому выделение проводили порционным методом (рис. 5).

Жесткие условия элюции белков mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆ с частицами «Silica», «Силохрома» и «CPG-10» вызвали освобождение значительного количества сорбированных клеточных белков *E. coli*, которые значительно загрязняли элюаты (рис. 5, линии 1–15). В целом эта картина говорит о том, что сильное удержание белков обусловлено, скорее всего, неспецифическими гидрофобными взаимодействиями, так как высокие концентрации ионов не освобождали контаминантные белки [14, 18].

Сравнивая результаты электрофореза и блота (рис. 5), можно отметить, что использование «CPG-10» как аффинного хроматографического носителя, специфического в отношении L2 домена клонированных белков mCherry-L2-His₆

и EGFP-L2-His₆, показало наилучшие результаты в отношении чистоты целевого продукта. Кроме того, происходило обогащение элюированных фракций как белком mCherry-L2-His₆, так и белком EGFP-L2-His₆ (рис. 5, линии 7, 15, 22, 30). Результаты хроматографии белка EGFP-L2-His₆ отличались от mCherry-L2-His₆, так, в элюате с частицами «Silica» методом иммуноблота обнаружили минимальное количество белка EGFP-L2-His₆, большие количества белка элюировали с «Силохром» и «CPG-10». Вероятно, это объяснялось присутствием 6 М мочевины в хроматографических буферах и тем, что связывание белка с носителями происходило в его денатурированной форме.

Заключение

В настоящее время хорошо исследованы условия использования различных аффинных меток, предложены многочисленные методики и промышленные технологии их применения. Полученные нами результаты лежат в русле представлений о механизмах связывания Si-метки с поверхностями диоксида кремния [14, 19]. Авторы указанных работ отмечали сильное связывание исследуемых белковых объектов: так, бактериальный 50S рибосомальный белок L2 прочно связывался с поверхностями кремнезема даже в присутствии высоких концентраций солей, детергентов и денатурирующих агентов, таких как 8 М мочевина. В основе этого явления лежит тот факт, что определенные области белка L2, богатые положительно заряженными остатками, не имеют четко определенной трехмерной структуры в физиологических условиях. Из-за присущей белку гибкости Si-метка может охватывать большую межмолекулярную область и оптимизировать свою структуру для поверхностных взаимодействий за счет конформационной адаптации на месте связывания. Благодаря этой конформационной адаптации Si-метки может оптимизировать взаимодействие между его положительно заряженными боковыми цепями и ионизированными поверхностными силанольными группами, а также между неполярными боковыми цепями белка и гидрофобными участками диоксида кремния. Совокупный вклад этих контактов усиливал связывание Si-метки и приводил к практически необратимому связыванию. Наше исследование на моделях белков mCherry-L2-His₆ и EGFP-L2-His₆ подтвердило большой потенциал для соединения биомолекул с неорганическими материалами.

Полученные гибридные конструкции белков не обеспечивали эффективного выделения и очистки целевых продуктов на диоксиде кремния. Проблему отщепления необратимо связанных гибридных белков решают введением специфических сайтов самоотщепления эндо- либо экзопротеазами, что позволяет оставить на дешевом носителе необратимо связанную часть гибридного белка и отщепить нужный нам белок в чистом виде. Это открывает дорогу для дальнейших исследований и практического использования полученных знаний.

Благодарность

Авторы выражают благодарность ведущему научному сотруднику ФБУН ГНЦГМБ, канд. биол. наук Платонову М.Е. за конструирование плазмид pET32b-L2(201-273)-Xho,

pET32b-mCherry-L2(201-273)-Xho и *pET32b-EGFP-L2(201-273)-Xho*.

Gratitude

The authors are grateful to leading researcher of SRCAMB, Dr. M.E. Platonov for the construction of plasmids *pET32b-L2(201-273)-Xho*, *pET32b-mCherry-L2(201-273)-Xho* and *pET32b-EGFP-L2(201-273)-Xho*.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Funding information

The work was carried out within the framework of the industry 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 / References

1. Arnau J, Lauritzen C, Petersen GE, Pedersen J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif.* 2006 Jul;48(1):1-13. DOI: 10.1016/j.pep.2005.12.002
2. Hearn MT, Acosta D. Applications of novel affinity cassette methods: use of peptide fusion handles for the purification of recombinant proteins. *J Mol Recognit.* 2001 Nov-Dec;14(6):323-69. DOI: 10.1002/jmr.555
3. Nilsson J, Ståhl S, Lundberg J, Uhlén M, Nygren PA. Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins. *Protein Expr Purif.* 1997 Oct;11(1):1-16. DOI: 10.1006/prep.1997.0767
4. Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003 Jan;60(5):523-33. DOI: 10.1007/s00253-002-1158-6
5. Hochuli E, Döbeli H, Schacher A. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr.* 1987 Dec 18;411:177-84. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)93969-4
6. Horchani H, Fendri A, Louati H, Sayari A, Gargouri Y, Verger R. Purification, biochemical and kinetic properties of recombinant *Staphylococcus aureus* lipase. *Methods Mol Biol.* 2012;861:267-82. DOI: 10.1007/978-1-61779-600-5_16
7. di Guan C, Li P, Riggs PD, Inouye H. Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene.* 1988 Jul 15;67(1):21-30. DOI: 10.1016/0378-1119(88)90004-2
8. Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene.* 1988 Jul 15;67(1):31-40. DOI: 10.1016/0378-1119(88)90005-4

9. Coolbaugh MJ, Wood DW. Purification of *E. coli* proteins using a self-cleaving chitin-binding affinity tag. *Methods Mol Biol.* 2014;1177:47-58. DOI: 10.1007/978-1-4939-1034-2_4
10. Guillén D, Moreno-Mendieta S, Aguilera P, Sánchez S, Farres A, Rodríguez-Sanoja R. The starch-binding domain as a tool for recombinant protein purification. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013 May;97(9):4141-8. DOI: 10.1007/s00253-013-4778-0. Epub 2013 Mar 16. Erratum in: *Appl Microbiol Biotechnol.* 2021 Oct;105(19):7551-7552.
11. Li J, Zhang Y, Yang Y. Characterization of the diatomite binding domain in the ribosomal protein L2 from *E. coli* and functions as an affinity tag. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013 Mar;97(6):2541-9. DOI: 10.1007/s00253-012-4367-7
12. Taniguchi K, Nomura K, Hata Y, Nishimura T, Asami Y, Kuroda A. The Si-tag for immobilizing proteins on a silica surface. *Biotechnol Bioeng.* 2007 Apr 15;96(6):1023-9. DOI: 10.1002/bit.21208
13. Ikeda T, Hata Y, Ninomiya K, Ikura Y, Takeguchi K, Aoyagi S, Hirota R, Kuroda A. Oriented immobilization of antibodies on a silicon wafer using Si-tagged protein A. *Anal Biochem.* 2009 Feb 1;385(1):132-7. DOI: 10.1016/j.ab.2008.11.001
14. Ikeda T, Ninomiya K, Hirota R, Kuroda A. Single-step affinity purification of recombinant proteins using the silica-binding Si-tag as a fusion partner. *Protein Expr Purif.* 2010 May;71(1):91-5. DOI: 10.1016/j.pep.2009.12.009
15. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1982, 480 p.
16. Li J, Dong Y, Zhang Y, Yang Y. Purification of recombinant EGFP by fusion with L2 (252-273) from ribosomal protein L2 using magnetic particles. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2013 Feb 15;917-918:30-5. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.01.002
17. Nawrocki J. The silanol group and its role in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.* 1997;779(1-2):29-71.
18. Periasamy A, Shadiac N, Amalraj A, Garajová S, Nagarajan Y, Waters S, et al. Cell-free protein synthesis of membrane (1,3)- β -d-glucan (curdlan) synthase: co-translational insertion in liposomes and reconstitution in nanodiscs. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Feb;1828(2):743-57. DOI: 10.1016/j.bbame.2012.10.003
19. Ikeda T, Kuroda A. Why does the silica-binding protein "Si-tag" bind strongly to silica surfaces? Implications of conformational adaptation of the intrinsically disordered polypeptide to solid surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2011 Sep 1;86(2):359-63. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.04.020

Информация о соавторах:

Копылов Павел Христофорович, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Дентовская Светлана Владимировна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Pavel Kh. Kopylov, Leading Researcher of Laboratory for Plague Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Svetlana V. Dentovskaya, MD, PhD, DSc, Chief Researcher of Laboratory for Plague Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

О прогнозировании сроков годности сыворотки листериозной агглютинирующей сухой

Н.М.Андреевская, Н.М.Хаптанова, Ж.А.Коновалова, Н.Г.Гефан,
И.Б.Вершинская, И.И.Баертуева, С.В.Балахонов

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»
Роспотребнадзора, Иркутск, Российская Федерация

Описаны результаты изучения стабильности основных показателей качества медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Сыворотка листериозная агглютинирующая сухая для реакции агглютинации (сыворотка листериозная)», разработанного на базе ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора, для обоснования срока годности и рекомендуемых условий хранения при использовании в условиях реального времени. При этом одним из основных критериев изучения стабильности является исследование показателей качества во время хранения образцов не только в первичной упаковке (ампуле), но и после первого вскрытия (период использования восстановленного препарата) и в условиях, имитирующих транспортирование. На основании данных, полученных в долгосрочных испытаниях, рекомендован срок годности в течение пяти лет. Экспериментально доказано, что в течение этого периода времени качественные показатели препарата остаются на уровне, соответствующем требованиям технической и эксплуатационной документации. В процессе применения восстановленный препарат характеризуется стабильностью своих биологических и физико-химических свойств в течение 32 ч при температуре хранения $5 \pm 3^\circ\text{C}$. В условиях, имитирующих транспортирование в диапазоне температур от -20 до $+20^\circ\text{C}$ листериозная сыворотка соответствовала своим функциональным характеристикам в течение 7 суток.
Ключевые слова: стабильность, срок годности, условия хранения, сыворотка листериозная, реакция агглютинации, листериоз

Для цитирования: Андреевская Н.М., Хаптанова Н.М., Коновалова Ж.А., Гефан Н.Г., Вершинская И.Б., Баертуева И.И., Балахонов С.В. О прогнозировании сроков годности сыворотки листериозной агглютинирующей сухой. Бактериология. 2023; 8(1): 51–55. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-51-55

Shelf life prediction of the dry agglutinating listeria serum

N.M.Andreevskaya, N.M.Khaptanova, Zh.A.Konvalova, N.G.Gefan,
I.B.Vershinskaya, I.I.Baertueva, S.V.Balakhonov

Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and the Far East of Rosпотребнадзор, Irkutsk, Russian Federation

The results of studying the stability of the main quality indicators of a medical device for *in vitro* diagnostics «Dry listeria agglutinating serum for agglutination reaction (listeria serum)», developed on the basis of the Irkutsk Scientific Research Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, are described to substantiate the shelf life and recommended storage conditions when used in real time. At the same time, one of the main criteria for studying stability is the study of quality indicators during the storage of samples not only in the primary package (ampoule), but also after the first opening (the period of use of the recovered drug) and in conditions simulating transportation. Based on the data obtained in long-term trials, a shelf life of five years is recommended.

It has been experimentally proven that during this period of time, the quality indicators of the drug remain at the level corresponding to the requirements of technical and operational documentation. During application, the reconstituted preparation is characterized by the stability of its biological and physico-chemical properties for 32 hours at a storage temperature of $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Under conditions simulating transportation in the temperature range from -20 to $+20^\circ\text{C}$, listeria serum corresponded to its functional characteristics for seven days.

Key words: stability, shelf life, storage conditions, listeriosis serum, agglutination reaction, listeriosis

Для цитирования: Andreevskaya N.M., Khaptanova N.M., Konvalova Zh.A., Gefan N.G., Vershinskaya I.B., Baertueva I.I., Balakhonov S.V. Shelf life prediction of the dry agglutinating listeria serum. Bacteriology. 2023; 8(1): 51–55. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-51-55

Для корреспонденции:

Коновалова Жанна Анатольевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела обеспечения качества ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора

Адрес: 664047, Иркутск, ул. Триллсера, 78
Телефон: (3952) 22-01-35

Статья поступила 14.02.2023, принята к печати 28.04.2023

For correspondance:

Zhanna A. Konvalova, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher of the Department of Quality Assurance, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and the Far East of Rosпотребнадзор

Address: 78 Trilisser str., Irkutsk, 664047, Russian Federation
Phone: (3952) 22-01-35

The article was received 14.02.2023, accepted for publication 28.04.2023

Листериоз – одна из самых тяжелых болезней пищевого происхождения. Его возбудителем является бактерия *Listeria monocytogenes*. Это относительно редко встречающееся заболевание – ежегодно происходит от 0,1 до 10 случаев заболевания на 1 млн человек в зависимости от стран и регионов. В Российской Федерации заболеваемость листериозом в период с 2005 по 2017 г. колебалась от 0,2 до 0,05 на 100 тыс. населения. И хотя случаев заболевания немного, эта инфекция представляет значительную проблему в области общественного здравоохранения в связи с высокой смертностью [1]. По сравнению с другими неспорообразующими патогенными бактериями, размножающимися в продуктах питания (сальмонеллы, энтерогеморрагическая кишечная палочка), *L. monocytogenes* устойчива к различным условиям окружающей среды, таким как высокая кислотность и концентрация соли. Листериозный микроб размножается в условиях низкого содержания кислорода и низких температур, обладая способностью выживать в течение длительного периода в окружающей среде, в пищевых продуктах, на перерабатывающих предприятиях и в домашних холодильниках. Несмотря на частое присутствие *L. monocytogenes* в сырых пищевых продуктах как растительного, так и животного происхождения, спорадические случаи или вспышки листериоза обычно связаны с готовыми к употреблению замороженными пищевыми продуктами и, зачастую, повторным заражением в последующем процессе приготовления пищи. В число пищевых продуктов высокого риска входят мясные полуфабрикаты и готовые к употреблению мясные продукты: прошедшие тепловую обработку, консервированные и/или ферментированные мясные продукты и сосиски; мягкие сыры; рыбная продукция холодного копчения [2].

Вместе с тем актуальность проблемы определяется трудностями в постановке диагноза в связи с полиморфизмом клинических проявлений заболевания (висцеральная, нервная, железистая, гастроэнтеритическая и смешанная формы, а также бессимптомное носительство листерий), зависящих от преобладания поражений отдельных органов и систем. Основные клинические проявления листериоза у людей – менингит, менингоэнцефалит, сепсис, выкидыши и мертворождение у беременных женщин, поэтому применение диагностических препаратов для быстрой индикации *L. monocytogenes* необходимо для своевременного начала терапии [3, 4].

В отечественной практике диагностические агглютинирующие листериозные сыворотки в сухом виде не производятся. В то же время отмечается высокая потребность клинических лабораторий практического здравоохранения в доступных коммерческих препаратах (медицинских изделиях для диагностики *in vitro* – МИ ИВД) для экспресс-диагностики листериоза [5].

К основным требованиям, предъявляемым к современным диагностическим препаратам для экспресс-анализа, относятся возможность выявления низких концентраций патогена в максимально короткие сроки и высокая специфичность, а в рамках валидации и стандартизации для обеспечения надлежащего качества, аналитической эффективности и безопасности на всех этапах жизненного цикла – способность сохранять свои свойства в пределах,

установленных нормативной документацией, в течение срока годности при соблюдении условий хранения и транспортировки [6, 7].

В соответствии с методическим документом одним из методов качественной идентификации возбудителя листериоза является реакция агглютинации (РА). Это быстрый и весьма специфичный метод [8]. Для выполнения таких исследований специалистами ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора разработано экспериментальное МИ ИВД «Сыворотка листериозная агглютинирующая сухая для реакции агглютинации (сыворотка листериозная)». Сыворотка листериозная предназначена для исследования потенциально инфицированного материала, а именно качественной идентификации листериозного микроба в культуре, выделенной из клинического материала. Область применения: клиническая лабораторная диагностика, диагностика инфекционных заболеваний, эпидемиологический надзор.

Срок годности и условия хранения устанавливаются в ходе изучения стабильности препаратов для диагностики *in vitro* в масштабе реального времени в соответствии с нормативными документами [9, 10]. При этом одним из основных критериев изучения стабильности является ее исследование во время хранения образцов в первичной упаковке промышленного выпуска, после первого открытия первичной упаковки (стабильность в открытой ампуле) и в условиях, имитирующих транспортирование.

Цель исследования – изучение стабильности основных показателей качества сыворотки листериозной для обоснования срока годности и рекомендуемых условий хранения при использовании.

Материалы и методы

Исследуемые образцы – экспериментальные серии «Сыворотки листериозной». Для определения срока годности при хранении (стабильность в реальном времени) использовали три серии препарата, для имитации транспортирования – одну серию, для оценки стабильности в процессе использования – также одну серию. При определении долговременной стабильности основных показателей качества «Сыворотки листериозной» испытываемые образцы хранили в холодильнике при температуре $5 \pm 3^\circ\text{C}$ в течение 6 лет (72 мес.). Для изучения стабильности в условиях долгосрочных испытаний (хранение в реальном времени) контрольные исследования проводили каждые 3 мес. в течение первого года (при выпуске, 3, 6, 9 и 12 мес.), каждые 6 мес. в течение второго года хранения (18 и 24 мес.) и ежегодно – на протяжении последующего периода испытаний (3, 4, 5 и 6-й год наблюдения). Количество контрольных временных точек составило 11. Общее количество наблюдений: постановки ориентировочной реакции агглютинации (ОРА) и развернутой реакции агглютинации (РРА) составило 44.

В тесте стабильности в процессе использования после вскрытия ампул – при температуре $5 \pm 3^\circ\text{C}$ в течение 32 ч (временные точки выемок: при выпуске, 12, 24 и 32 ч), при имитации условий транспортирования – при температуре 20°C , -20°C в течение 8 суток (временные точки выемок: при выпуске, далее ежедневно до 8 суток).

Таблица 1. Показатели титров антител сыворотки листериозной при исследовании стабильности в реальном времени

Критерий стабильности	№ серии	Вид РА	Периодичность контроля (годы)						
			при выпуске	1	2	3	4	5	6
Чувствительность	01	OPA	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100
		PPA	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400
	02	OPA	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100
		PPA	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400
	03	OPA	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100
		PPA	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400

Для экспериментального хранения исследуемых образцов в течение всего периода испытаний использовали лабораторный инкубатор Friocell термостат (BMT, Германия), биомедицинский морозильник MDF-136 (Sanyo Electric Co., Ltd, Япония), холодильник «Бирюса 134 KL» (ОАО «Красноярский завод холодильников Бирюса»). Для контроля использовали по три образца из каждой серии. За один образец принимали содержимое одной ампулы.

Критериями стабильности препарата служили его физико-химические (внешний вид, растворимость, pH, прозрачность, цветность) и биологические показатели – чувствительность (специфическая активность) и специфичность. Внешний вид, растворимость, прозрачность, цветность «Сыворотки листериозной» определяли визуально при естественном освещении по ГОСТ Р 51352-2013 [11]. Показатели pH оценивали потенциометрическим методом. Контроль потери в массе при высушивании проводили весовым методом. Для контроля использовали содержимое ампул в количестве 0,15–0,20 г [12].

Биологические показатели (чувствительность и специфичность) препарата определяли в OPA и PPA при исследовании чистой культуры штаммов возбудителя листериоза *L. monocytogenes* 766; *L. monocytogenes* 3657; *L. monocytogenes* 156; *L. monocytogenes* 1588 и штаммов гетерологичных микроорганизмов: *L. innocua* 6a ; *L. ivanovii* 97 к-88; *Escherichia coli* ATCC 25922 (F-50); *Yersinia enterocolitica* 03 628/1; *Shigella flexneri* 170; *Salmonella Typhimurium* 21; *Salmonella Enteritidis Gartneri*; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, полученные из отдела «Коллекция патогенных бактерий» ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора.

Учет результатов реакции агглютинации проводили по четырехкрестовой схеме в соответствии с ТУ 21.20.23-015-01898090-2018. РА считается положительной на 3–4 креста. Реакция на 1–2 креста не учитывается.

Результаты и обсуждение

Результаты контроля испытуемых образцов «Сыворотки листериозной» показывают, что после 6 лет хранения при температуре от 2 до 8°C качественные показатели препарата оставались в пределах, установленных в нормативных документах интервалов, и сохраняли стабильность без изменения внешнего вида, растворимости, pH, прозрачности, цветности, чувствительности и специфичности. Следует отметить, что показатели чувствительности (табл. 1) и специфичности составляли 100%.

Далее были проведены исследования по определению стабильности сохранения свойств препарата после вскрытия ампулы и приготовления рабочего разведения. Содержимое ампул растворяли в 1,0 мл дистиллированной воды. После полного ресуспендирования готовили рабочее разведение препарата 1:50, используя фосфатно-солевой буфер. Испытуемые образцы препарата после вскрытия ампул в процессе использования хранили в холодильнике при температуре от 2 до 8°C в течение всего периода испытаний. Качество экспериментальной серии препарата оценивали по внешнему виду и биологическим показателям через каждые 12 ч хранения в течение 32 ч.

Установлено, что все испытуемые образцы при температуре хранения от 2 до 8°C сохраняли стабильность без изменения внешнего вида, чувствительности (титр в OPA – 1:100, в PPA – 1:400) и специфичности в течение 32 ч наблюдения.

По совокупности полученных результатов установлено, что рабочее разведение сыворотки листериозной допускается хранить при температуре +2–8°C не более одних суток.

Результаты изучения стабильности по имитации условий транспортирования МИ ИВД «Сыворотка листериозная» представлены в табл. 2.

Установлено, что внешний вид и чувствительность (специфическая активность) и специфичность испытуемой серии МИ ИВД «Сыворотка листериозная» соответствовали заявленным характеристикам и оставались без изменений при хранении при температурах +20°C, -20°C в течение 7 суток. Показано, что на восьмые сутки наблюдения происходит снижение титров антител при +20°C в 2 раза.

Заключение

МИ ИВД стабильно сохраняло все физико-химические показатели независимо от температуры и временного интервала во всех испытуемых сериях, препарат полностью растворялся в течение 1 мин при встряхивании и представлял собой опалесцирующую жидкость розовато-желтого цвета, без осадка. Количественные показатели pH, потеря в массе при высушивании соответствовали пределам значений, отраженных в нормативной документации МИ ИВД «Сыворотка листериозная».

Результаты испытаний биологических показателей «Сыворотки листериозной» показали, что выявление штаммов возбудителя листериоза составило 100% независимо от условий и продолжительности хранения образцов, также

Таблица 2. Оценка стабильности медицинского изделия «Сыворотка листериозная» по внешнему виду, аналитическим характеристикам при транспортировании от +20 до -20°C

Наименование показателя	Характеристика и нормы	Температура, °C	Значения качественных показателей по временным контрольным точкам				
			при выпуске	2 дня	4 дня	7 дней	8 дней
Внешний вид лиофилизированной сыворотки	Аморфная масса белого цвета с розоватым или желтоватым оттенком	+20	+	+	+	+	+
		-20	+	+	+	+	+
Растворимость	В течение 10 мин в 1 мл стерильной дистиллированной воды	+20	1 мин	1 мин	1 мин	1 мин	1 мин
		-20	1 мин	1 мин	1 мин	1 мин	1 мин
Прозрачность	Растворенная сыворотка должна быть прозрачной или слегка опалесцирующей	+20	+	+	+	+	+
		-20	+	+	+	+	+
Цветность	Растворенная сыворотка должна быть от светловато-кремового до розовато-желтого цвета	+20	+	+	+	+	+
		-20	+	+	+	+	+
рН	От 7,5 до 8,5	+20	7,66	7,66	7,66	7,66	7,66
		-20	7,55	7,55	7,55	7,55	7,55
Чувствительность (специфическая активность)	Сыворотка должна агглютинировать штаммы <i>L. monocytogenes</i> в РРА не менее 1: 400, в ОРА в разведении не менее 1:100	+20	1:400/ 1:100	1:400/ 1:100	1:400/ 1:100	1:400/ 1:100	1:200/ 1:100
		-20	1:400/ 1:100	1:400/ 1:100	1:400/ 1:100	1:400/ 1:100	1:400/ 1:100
Специфичность	Сыворотка не должна агглютинировать штаммы гетерологичных микроорганизмов в разведении более 1/10 титра	+20	+	+	+	+	+
		-20	+	+	+	+	+

«+» – критерий соответствует нормативной документации.

была подтверждена высокая специфичность при отсутствии перекрестных реакций с штаммами гетерологичных микроорганизмов.

Таким образом, на основании данных, полученных при испытаниях в реальном времени, после первого открытия ампулы и восстановления препарата, в условиях имитации транспортирования, можно рекомендовать срок годности медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Сыворотка листериозная» в течение 5 лет. Экспериментально доказано, что в течение этого периода качественные показатели препарата остаются на уровне, соответствующем требованиям нормативных документов.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Financial support

The work was carried out within the framework of budget financing.

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. Еремушкина ЯМ, Кускова ТК, Смирнова ТЮ. Листериоз как одна из причин неблагоприятных исходов у пациентов с иммуносупрессивными состояниями. Лечащий врач. 2020;4:60-63. DOI: 10.26295/OS.2020.48.47.011

- CAC/GL 61-2007 Guidelines on the Application of General Principles of Food Hygiene to the Control of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods.
- Гальцева ГВ, Федоренко ЛМ, Ингватова ВБ, Буланова ЕЕ. Лабораторная диагностика листериоза. Успехи современного естествознания. 2006;1:52-53.
- СанПин 3.3686-21. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней. Утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 28-01-2021.
- Омарова СМ. Современные препараты для диагностики листериоза. Успехи современного естествознания. 2007;3:97-98.
- Старцева ОЛ, Курчева СА. Прогнозирование сроков годности иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих туляреминых сухих. Здоровье населения и среда обитания. 2019;2(311):56-60. DOI: 10.35627/2219-5238/2019-311-2-56-60
- Куличенко АН, Зуенко АА, Коготкова ОИ, Гридина ТМ, Лямкин ГИ, Ляпустина ЛВ. Изучение стабильности производства и основных показателей качества диагностикума бруцеллезного жидкого для реакции агглютинации, суспензии для диагностических целей. Современные проблемы науки и образования. 2013;6:720-726.
- Методические рекомендации по лабораторной диагностике листериоза животных и людей Минздрава СССР от 04.09.1986, 57 с.
- ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Оценка стабильности реагентов для диагностики *in vitro*. Утв. приказом Росстандарта от 27.04.2015 №301-ст.
- Общая фармакопейная статья «Стабильность и сроки годности лекарственных средств»: ОФС.1.1.0009.18. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. М., 2018.
- ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Методы испытаний.
- Фармакопея Евразийского экономического союза. Введ. 2021-03-01 Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 11.08.2020 №100 «О Фармакопее Евразийского экономического союза»; 2020, 566 с.

References

1. Yermushkina YaM, Kuskova TK, Smirnova TY. Listeriosis as one of the causes of adverse outcomes in patients with immunosuppressive conditions. *Lechaschi Vrach Journal*. 2020;4:60-63. DOI: 10.26295/OS.2020.48.47.011 (In Russian).
2. CAC/GL 61-2007 Guidelines on the Application of General Principles of Food Hygiene to the Control of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods.
3. Galtseva GV, Fedorenko LM, Ingevatova VB, Bulanova EE. Laboratory diagnostics of listeriosis. *Advances in Current Natural Sciences*. 2006;1:52-53. (In Russian).
4. SanPiN 3.3686-21. Sanitary and epidemiological requirements for the prevention of infectious diseases. Approved. Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation 28-01-2021. (In Russian).
5. Omarova SM. Modern preparations for listeriosis diagnostics. *Advances in Current Natural Sciences*. 2007;3:97-98. (In Russian).
6. Startseva OL, Kurcheva SA. Shelf life prediction of diagnostic fluorescent tularemia dry immunoglobulins. *Public Health and Life Environment*. 2019;2(311):56-60. DOI: 10.35627/2219-5238/2019-311-2-56-60 (In Russian).
7. Kulichenko AN, Zuenko AA, Kogotkova OI, Gridina TM, Lyamkin GI, Lyapustina LV. Studies of production stability and of quality indexes of the brucellosis diagnosticum, liquid for agglutination test, suspensions for diagnostic purposes. *Modern Problems of Science and Education*. 2013;6:720-726. (In Russian).
8. Methodological recommendations for laboratory diagnostics of listeriosis of animals and humans of the USSR Ministry of Health dated 04.09.1986. 57 p. (In Russian).
9. GOST R ISO 23640-2015 *In vitro* medical devices. Evaluation of stability of *in vitro* diagnostic reagents. 01-06-2016. Moscow: "Standartinform" Publ.; 2015, 10 p. (In Russian).
10. General Pharmacopoeia article "Stability and shelf life of medicines": OFS.1.1.0009.18. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed. M., 2018. (In Russian).
11. GOST R 51352-2013 *In vitro* diagnostic medical devices. Test methods. 01-01-2015. Moscow: "Standartinform" Publ.; 2013, 29 p.
12. Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union. Introduction. 2021-03-01 by the Decision of the Board of the Eurasian Economic Commission of 11.08.2020 No 100 "On the Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union"; 2020, 566 p. (In Russian).

Информация о соавторах:

Андреевская Нина Михайловна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-производственного отдела ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора

Хаптанова Наталья Маркеловна, младший научный сотрудник отдела биологического и технологического контроля ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора

Гефан Наталья Геннадьевна, кандидат медицинских наук, заведующая отделом биологического и технологического контроля ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора

Вершинская Ирина Борисовна, младший научный сотрудник научно-производственного отдела ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Баертуева Инна Ивановна, младший научный сотрудник научно-производственного отдела ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора

Балахонov Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, директор ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Nina M. Andreevskaya, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher of the Research and Production Department, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and the Far East of Rosпотребнадзор

Natalya M. Khaptanova, Junior Researcher of the Department of Biological and Technological Control, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and the Far East of Rosпотребнадзор

Natalya G. Gefan, MD, PhD, Head of the Department of Biological and Technological Control, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and the Far East of Rosпотребнадзор

Irina B. Vershinskaya, Junior Researcher of the Research and Production Department, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and the Far East of Rosпотребнадзор

Inna I. Baertueva, Junior Researcher of the Research and Production Department, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and the Far East of Rosпотребнадзор

Sergei V. Balakhonov, MD, PhD, DSc, Professor, Director, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and the Far East of Rosпотребнадзор

НОВОСТИ НАУКИ

Сточные воды являются более мощной средой для развития устойчивости к антибиотикам

Появление и распространение мобильных генов устойчивости к антибиотикам (ARG) у патогенов стало серьезной угрозой для глобального здравоохранения. До сих пор мало что известно о том, где ARG получают мобильность в первую очередь. Здесь мы стремились собрать доказательства, указывающие на то, где могли произойти такие начальные события мобилизации клинически значимых ARG. Мы обнаружили, что большинство ранее идентифицированных исходных видов не несли мобилизующих элементов, которые, вероятно, обеспечивали внутриклеточную мобильность ARG, что предполагает необходимое взаимодействие между различными бактериями. Анализ широкого круга метагеномов показал, что сточные воды и среда, подвергаясь воздействию сточных вод, имеют, безусловно, самое высокое количество как исходных видов, так и соответствующих мобилизующих элементов. Большинство исходных видов лишь изредка обнаруживались в других средах. Совместное появление исходных видов и соответствующих мобилизующих элементов в микробиоте человека было редкостью. Наши результаты идентифицируют сточные воды и окружающую среду, затронутую сточными водами, как вероятные арены для первоначальной мобилизации генов устойчивости.



Berglund F, Ebmeyer S, Kristiansson E, et al.

Evidence for wastewaters as environments where mobile antibiotic resistance genes emerge. Commun Biol. 2023;6:321. DOI: 10.1038/s42003-023-04676-7

Иммунный статус детей с коли-инфекцией, вызванной гемолитической кишечной палочкой

М.И.Юсупов

Самаркандский медицинский университет, Самарканд, Узбекистан

В ходе исследования анализировали кровь 28 детей в возрасте до 5 лет, инфицированных гемолитическими эшерихиями. Детей разделяли на 3 возрастные группы в соответствии с критическими периодами развития иммунной системы человека: 1-я группа – 9 детей в возрасте 0–6 мес.; 2-я группа – 10 детей в возрасте от 6 мес. до 2 лет; 3-я группа – 9 детей в возрасте от 2 до 5 лет. Изменения в формировании иммунного ответа наблюдались у детей 2–5 лет в 3-м и 4-м критических периодах. В частности, наблюдалось значительное снижение CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ и CD16⁺-лимфоцитов на фоне активации гуморального иммунитета.

Ключевые слова: цитокины, иммуноглобулины, кишечная палочка, иммунитет, лимфоциты, критический период

Для цитирования: Юсупов М.И. Иммунный статус детей с коли-инфекцией, вызванной гемолитической кишечной палочкой. Бактериология. 2023; 8(1): 56–58. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-56-58

Immune status of children with coli infection caused by hemolytic *E. coli*

M.I.Yusupov

Samarkand Medical University. Samarkand, Uzbekistan

The blood of 28 children under the age of 5 years infected with hemolytic *Escherichia* has been analyzed. The children were divided into 3 age groups according to the critical periods in the development of the human immune system: 1st group – 9 children aged 0–6 months; 2nd group – 10 children aged 6 months up to 2 years; 3rd group – 9 children aged 2 to 5 years. Changes in the formation of the immune response were observed in children aged 2–5 years in the 3rd and 4th critical periods. In particular, there was a significant decrease in CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and CD16⁺-lymphocytes against the background of activation of humoral immunity.

Key words: cytokines, immunoglobulins, *E. coli*, immunity, lymphocytes, critical period

For citation: Yusupov M.I. Immune status of children with coli infection caused by hemolytic *E. coli*. Bacteriology. 2023; 8(1): 56–58. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-56-58

В настоящее время основное внимание исследователей сосредоточено на иммунопатогенезе кишечных инфекций [1]. В норме организм имеет бимодальный характер при реагировании на раздражитель [2]. В последние годы предполагается, что цитокины играют основную роль в защите организма от бактериальных и вирусных инфекций [3]. Цитокины играют ключевую роль в межклеточных отношениях, длительности и интенсивности воспалительного процесса, формировании иммунного ответа [4, 5]. Одним из важных научных направлений в лечении острых кишечных заболеваний является изучение влияния кишечной микро-

флоры на иммунную систему детей [6, 7]. Т.А.Федотова с соавт. обнаружили снижение концентрации IgA и IgG в сыворотке крови больных с развившимся дисбиозом [8]. С.Е.Чащина с соавт. установили, что 77% случаев инфекционного энтероколита у детей вызываются гемолитическими эшерихиями, при этом у этих больных отмечено снижение количества Т-лимфоцитов и IgG ($0,2 \pm 0,02$ мкг/мл) [9].

Цель исследования: изучить клеточный и гуморальный иммунный статус у детей до 5 лет с гемолитическими эшерихиями, находящимися в критических периодах развития иммунной системы.

Для корреспонденции:

Юсупов Машраб Исматиллович, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Самаркандского медицинского университета
Адрес: Узбекистан, Самаркандская обл., Массив карасув, 110/59
Телефон: +998979196449

Статья поступила 12.04.2023, принята к печати 28.04.2023

For correspondence:

Mashrab I. Yusupov, Assistant of the Department Microbiology, Virology and Immunology, Samarkand Medical University
Address: 110/59 Massif karasuv, Samarkand region, Uzbekistan,
Phone: +998979196449

The article was received 12.04.2023, accepted for publication 28.04.2023

Материалы и методы

В остром периоде заболевания у детей с эшерихиозами брали 5 мл крови из локтевой вены и определяли содержание субпопуляций Т-лимфоцитов, экспрессирующих поверхностные рецепторы CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ и CD16⁺, а также концентрации IgA, IgM и IgG в сыворотке крови в абсолютном выражении. Клеточный компонент иммунного ответа (уровни CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺ в периферической крови) определяли с использованием моноклональных антител, гуморальное звено (концентрацию IgM, IgA, IgG в периферической крови) – методом иммуноферментного анализа.

Результаты и обсуждение

В нашем исследовании мы разделили 28 детей в возрасте 0–5 лет, инфицированных коли-инфекциями, вызванными гемолитическими эшерихиозами, на 3 возрастные группы (2, 3, 4) в соответствии с критическими периодами развития иммунной системы человека: 1-я группа – 9 детей в возрасте 0–6 мес.; 2-я группа – 10 детей в возрасте от 6 мес. до 2 лет; 3-я группа – 9 пациентов в возрасте от 2 до 5 лет.

Иммунологические исследования проводили в динамике патологического процесса: в остром периоде заболевания

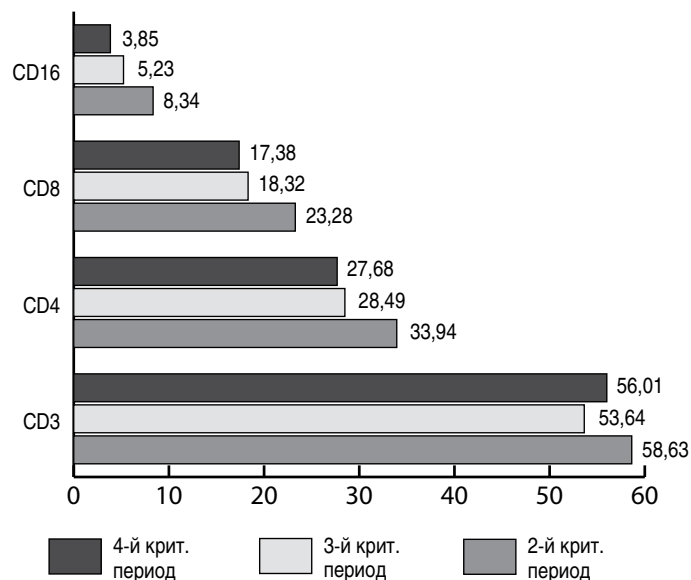


Рис. 1. Анализ уровня отклонения CD-лимфоцитов в крови в остром периоде заболевания.

(1–3-и сутки инфекционного процесса) и в раннем восстановительном периоде, результаты представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, у детей возрастной группы, соответствующей 2-му критическому периоду развития иммунной системы, содержание CD3⁺-клеток находится на нижней границе нормы при эшерихиозе. В 3-м и 4-м критических периодах содержание CD3⁺-клеток достоверно снижалось по сравнению с нормой ($p < 0,01$), CD4⁺-клетки были ниже нормы у детей во все критические периоды формирования иммунной системы. Клетки CD8⁺ были достоверно повышены относительно нормы во 2-м критическом периоде и достоверно снижены в 3-м и 4-м критических периодах. CD16⁺-клетки во 2-м критическом периоде находятся на нижней границе нормы; в 3-м и 4-м критических периодах они достоверно снижались по сравнению с нормой.

В течение исследуемого периода у всех больных детей в первые дни отмечалась тенденция к снижению количества CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺- и CD16⁺-лимфоцитов, а к 8–10-м суткам количество этих субпопуляций клеток увеличивалось (рис. 1).

Гуморальное звено иммунного ответа. Концентрации IgM, IgA, IgG в периферической крови у детей 3-го и 4-го критических периодов увеличивались незначительно по отношению к норме. В табл. 2 приведены данные об уровне иммуноглобулинов в сыворотке крови детей, больных эшерихиозами.

Из табл. 2 видно, что хотя концентрация IgM во 2-м критическом периоде у больных детей не изменилась по сравнению с нормой, количество IgM у болеющих эшерихиозом детей, находящихся в 3-м и 4-м критических периодах развития иммунной системы (до 2–5 лет) значительно увеличилось ($7,48 \pm 0,37$ г/л; $9,94 \pm 0,17$ г/л) ($p < 0,01$). Концентрация IgG достоверно снижалась у детей в 3-м и 4-м критических периодах ($0,69 \pm 0,15$ г/л; $0,81 \pm 0,10$ г/л).

Анализируя данные, представленные на рис. 2, мы видим, что концентрация IgG у детей до 6-месячного возраста, соответствующего 2-му критическому периоду, оставалась в пределах нормы, а в остальные периоды развития иммунной системы (у детей в возрасте 2–5 лет) этот показатель уменьшился. Напротив, IgM оставался на нормальном уровне у

Таблица 1. Абсолютные показатели количества субпопуляций Т-лимфоцитов в исследуемых группах

Показатели	2-й критический период, 0–6 мес. (n = 9)	3-й критический период (6 мес. – 2 года) (n = 10)	4-й критический период (2–5 лет) (n = 9)
CD3 ⁺ -лимфоциты	58,63 ± 0,71; $p^* > 0,05$	53,64 ± 0,63; $p^* < 0,001$; $p_{2-3} < 0,05$; $p_{1-2} < 0,01$	56,01 ± 0,54; $p^* < 0,05$; $p_{1-3} < 0,05$
CD4 ⁺ -лимфоциты	33,94 ± 0,38; $p^* < 0,05$	28,49 ± 0,55; $p^* < 0,001$; $p_{2-3} > 0,05$; $p_{1-2} < 0,001$	27,68 ± 0,61; $p^* < 0,001$; $p_{1-3} < 0,001$
CD8 ⁺ -лимфоциты	23,28 ± 0,31; $p^* < 0,05$	18,32 ± 0,41; $p^* < 0,001$; $p_{2-3} > 0,05$; $p_{1-2} < 0,001$	17,38 ± 0,72; $p^* < 0,001$; $p_{1-3} < 0,001$
CD16 ⁺ -лимфоциты	8,34 ± 1,45; $p^* < 0,05$	5,23 ± 1,32; $p^* < 0,001$; $p_{2-3} > 0,05$; $p_{1-2} < 0,001$	3,85 ± 0,22; $p^* < 0,001$; $p_{1-3} < 0,001$

Уровень вероятности p^* относительно к норме;
 p_{1-2} – показатели между 1-й и 2-й группами;
 p_{2-3} – показатели между 2-й и 3-й группами;
 p_{1-3} – показатели между 1-й и 3-й группами.

Таблица 2. Показатели IgA, IgM и IgG в сыворотке крови исследуемых групп, г/л

№	Показатели	2-й критический период, 0–6 мес. (n = 9)	3-й критический период, 6 мес. – 2 года (n = 10)	4-й критический период, 2–5 лет (n = 9)
1	IgA	0,35 ± 0,04 $p^* > 0,05$	0,71 ± 0,12; $p^* > 0,05$	1,14 ± 0,09; $p^* > 0,05$
2	IgM	0,64 ± 0,01 $p^* > 0,05$	7,48 ± 0,37; $p^* > 0,05$	9,94 ± 0,17; $p^* < 0,001$
3	IgG	6,01 ± 0,25 $p^* > 0,05$	0,69 ± 0,15; $p^* > 0,05$	0,81 ± 0,10; $p^* > 0,05$

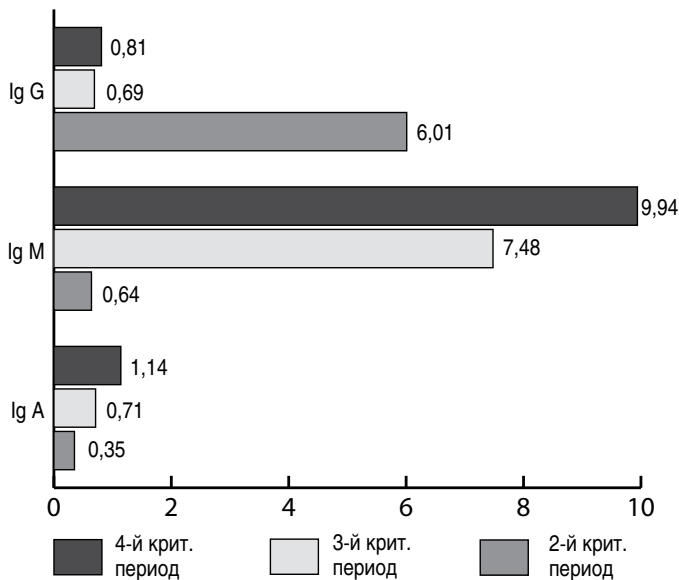


Рис. 2. Анализ иммуноглобулинов в крови в остром периоде заболевания.

детей до 6 мес. (2-й критический период), а в последующие периоды мы наблюдали увеличение этого показателя у детей в возрасте 2–5 лет.

Заключение

Таким образом, при заражении эшерихиями детей до 6 мес. (2-й критический период) достоверного изменения в изученных показателях клеточного звена иммунной системы не происходило. У детей 2–5 лет (3-й и 4-й критические периоды) наблюдалось значительное снижение содержания CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ и CD16⁺-лимфоцитов на фоне активации гуморального иммунитета.

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

The author declares that there is no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Юсупов МИ, Одилова ГМ, Жамалова ФА. Появление гемолитических свойств у кишечных палочек в зависимости от состава питательной среды. Экономика и социум. 2021;3-2(82):602-6.
2. Юсупов МИ, Шайкулов ХШ, Одилова ГМ. Антигенные сходства штаммов *E. coli*, выделенных от детей и их матерей. Проблемы биологии и медицины. 2020;6:202-5.
3. Мухамедов ИМ, Юсупов МИ, Шайкулов ХШ. Дифференциальный диагноз энтероколитов у детей. Innova. 2022;2(27):35-9.
4. Шайкулов ХШ, Исокулова ММ. Характеристика энтеропатогенных кишечных палочек, выделенных у детей раннего возраста. Экономика и социум. 2023;1-1(104).
5. Mashrab Y, Zhasur R, Shuxrat Z. The value of cytokines in children with escherichiosis. Journal of Biomedicine and Practice. 2022;7(4):58-63.
6. Хужакулов ДА. Особенности течения пищевых токсикоинфекций. Педиатр. 2017;8(S1).
7. Одилова ГМ, Юсупов МИ. Изменения комплементарной активности сыворотки крови у детей, больных острой дизентерией в сочетании с глистной инвазией. Бактериология. 2022;7(2):42-4. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-42-44
8. Федотова ТА, Михайленко АА, Сергеева СФ. Основные аспекты формирования хронической иммунной недостаточности и/или иммунопатологии у детей и подростков. Медицинская иммунология. 2006;8(1):101-4.
9. Чащина СЕ. Клинико-иммунологические особенности острых инфекционных энтероколитов у детей раннего возраста. Автореф. ...к.м.н. Свердловск, 1990, 22 с.

References

1. Yusupov MI, Odilova GM, Zhamalova FA. The appearance of hemolytic properties in *E. coli*, depending on the composition nutrient medium. Ekonomika i sotsium. 2021;3-2(82):602-6. (In Russian).
2. Yusupov MI, Shaikulov X Sh, Odilova GM. Antigenic similarities of *E. coli* strains isolated from children and their mothers. Problems of Biology and Medicine. 2020;6:202-5. (In Russian).
3. Mukhamedov IM, Yusupov MI, Shaikulov HS. Differential diagnosis of enterocolitis in children. Innova. 2022;2(27):35-9. (In Russian).
4. Shaikulov HSH, Isakulova MM. Characteristics of enteropathogenic *E. coli* isolated in young children. Ekonomika i sotsium. 2023;1-1(104). (In Russian).
5. Mashrab Y, Zhasur R, Shuxrat Z. The value of cytokines in children with escherichiosis. Journal of Biomedicine and Practice. 2022;7(4):58-63.
6. Khuzhakulov DA. Features of the course of food toxicoinfections. Pediatrician (St. Petersburg). 2017;8(S1). (In Russian).
7. Odilova GM, Yusupov MI. Changes in the complementary activity of the blood serum in children with acute dysentery in combination with helminthic invasion. Bacteriology. 2022;7(2):42-4. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-2-42-44 (In Russian).
8. Fedotova TA, Mikhailenko AA, Sergeeva SF. Basic aspects of development of chronic immune deficiency. Med. Immunol. 2006;8(1):101-4. (In Russian).
9. Chashchina SE. Clinical and immunological features of acute infectious enterocolitis in young children. Diss. Sverdlovsk, 1990, 22 p. (In Russian).

Хроническое брюшнотифозное бактерионосительство: проблемы и пути решения

И.Х.Маматкулов¹, П.Е.Игнатов², А.И.Маматкулов³, Л.В.Кудашева⁴

¹Узбекский химико-фармацевтический научно-исследовательский институт, Ташкент, Республика Узбекистан;

²IGN-International, Лос-Анджелес, США;

³Ташкентский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток, Ташкент, Республика Узбекистан;

⁴Служба санитарно-эпидемиологического благополучия и общественного здоровья, Ташкент,

Республика Узбекистан

Данная научная работа посвящена существующим проблемам по борьбе с брюшным тифом, в частности, формированию и распространенности хронического брюшнотифозного бактерионосительства, влиянию биологических свойств возбудителя брюшного тифа на процент формирования носительства и эффективности этиотропной терапии. Если левомецетин- и ампициллин-чувствительные штаммы формировали 5% хронического бактерионосительства, то штаммы, резистентные к этим антибиотикам, – более 50%. В данном труде описывается предлагаемый новый метод санации (лечения) основных источников возбудителя инфекции – хронических брюшнотифозных бактерионосителей – специфической брюшнотифозной молекулярной вакциной жидкой (БМВ). Образно говоря, предлагается инновационный способ прерывания эпидемической цепи посредством нейтрализации первого звена эпидемического процесса брюшнотифозной инфекции.

Ключевые слова: хронический брюшнотифозный бактерионоситель, лечебно-профилактическая вакцина, брюшнотифозная молекулярная вакцина, источник инфекции, санация, нейтрализация

Для цитирования: Маматкулов И.Х., Игнатов П.Е., Маматкулов А.И., Кудашева Л.В. Хроническое брюшнотифозное бактерионосительство: проблемы и пути решения. Бактериология. 2023; 8(1): 59–61. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-59-61

Chronic typhoid bacteriosis: problems and solutions

I.Kh.Mamatkulov¹, P.E.Ignatov², A.I.Mamatkulov³, L.V.Kudasheva⁴

¹Academician A. Sultanov Uzbek Chemical and Pharmaceutical Research Institute, Tashkent, Republic of Uzbekistan;

²IGN-International, Los Angeles, USA;

³Tashkent Research Institute of Vaccines and Serums, Tashkent, Republic of Uzbekistan;

⁴Sanitary and Epidemiological Welfare and Public Health Service of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Republic of Uzbekistan

This scientific work is devoted to the existing problems in the fight against typhoid fever, in particular, the formation and prevalence of chronic typhoid bacteriocarrier, the influence of the biological properties of the causative agent of typhoid fever on the percentage of carrier formation and the effectiveness of etiotropic therapy. If levomycetin and ampicillin sensitive strains formed 5% of chronic bacteriocarrier, then strains resistant to these antibiotics – more than 50%. This work describes the proposed new method of rehabilitation (treatment) of the main sources of the causative agent of infection – chronic typhoid bacteriocarrier – specific typhoid molecular vaccine liquid (BMV). Figuratively speaking, an innovative way is proposed to interrupt the epidemic chain by neutralizing the first link in the epidemic process of typhoid infection.

Key words: chronic typhoid bacteriocarrier, treatment-and-prophylactic vaccine, BMV, source of infection, sanitation, neutralization

For citation: Mamatkulov I.Kh., Ignatov P.E., Mamatkulov A.I., Kudasheva L.V. Chronic typhoid bacteriosis: problems and solutions. Bacteriology. 2023; 8(1): 59–61. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-59-61

Для корреспонденции:

Маматкулов Иброхим Хомидович, доктор медицинских наук, профессор, действительный член Академии наук «Турон», директор Узбекского химико-фармацевтического научно-исследовательского института им. академика А.Султанова

Адрес: 100084, Республика Узбекистан, Ташкент, Юнусабадский район, ул. Чингиза Айтматова, 37
Телефон: (+998) 71 234-77-67

Статья поступила 15.01.2023, принята к печати 28.04.2023

For correspondence:

Ibrokhim Kh. Mamatkulov, MD, PhD, DSc, Professor, Full Member of the Academy of Sciences «Turon», Director of the Academician A.Sultanov Uzbek Chemical and Pharmaceutical Research Institute

Address: 37 Chingiz Aitmatov str., Yunusabad district, Tashkent, 100084, Republic of Uzbekistan
Phone: (+998) 71 234-77-67

The article was received 15.01.2023, accepted for publication 28.04.2023

Целью исследования было изучение формирования и распространенности хронического брюшнотифозного бактерионосительства в различные периоды, влияния биологических свойств возбудителя брюшного тифа на формирование носительства, а также представление инновационного способа борьбы с брюшным тифом.

Брюшной тиф и абдоминальные паратифы А и В, составляющие группу тифо-паратифозных инфекций, распространены повсеместно и встречаются на всех континентах мира. Проблема заболеваемости брюшным тифом в глобальном аспекте остается нерешенной из-за отсутствия эффективных, с высокой иммуногенностью, специфических иммунобиологических препаратов, используемых как для профилактики (вакцинации подлежащего контингента), так и для нейтрализации источников инфекции – хронических носителей возбудителя брюшного тифа.

В современных условиях изменилась значимость различных категорий источников инфекций в распределении заразного начала. Роль больного с типичной формой заболевания в этом отношении сведена до минимума. Согласно данным авторов данного сообщения, только 6% больных с типичной формой болезни служили источником заражения. О резком уменьшении значения больных с типичной формой заболевания, выявляемых как источник инфекции, можно судить и по числу повторных заболеваний в очагах, которые составляют около 3% от общей заболеваемости. Такое положение было связано со 100%-й госпитализацией больных с типичным течением болезни в ранние сроки от начала заболевания. Именно по этой причине в настоящее время роль хронических бактерионосителей как источников инфекции особенно велика. Особое значение в этом отношении имеют невыявленные хронические бактерионосители, которые не знают о своей опасности для окружающих. Согласно данным различных исследователей и результатам наблюдений авторов, хроническое носительство формируется в 5% случаев после

перенесенного брюшного тифа и в 6–7% – после паратифа В. Заражение от бактерионосителя в основном происходит благодаря участию различных факторов внешней среды, которые ими интенсивно инфицируются; чаще всего это вода открытых водоемов. Учитывая данные авторов 1980-х гг. о высокой заболеваемости этими инфекциями в республике на протяжении длительного времени, можно предположить, что число хронических бактерионосителей было значительным. Однако выявление этих источников инфекции в Узбекистане осуществляется далеко не полно, хотя всем хорошо известно, что выявленный хронический бактерионоситель, знающий о своей эпидемиологической опасности, в окружении которого осуществляется определенный комплекс мероприятий, почти никогда не заражает лиц, общавшихся с ним. Авторами, исходя из зарегистрированных за 1967–1979 гг. случаев заболеваемости брюшным тифом и паратифами и частоты обнаружения хронических бактерионосителей возбудителей этих инфекций, произведен примерный расчет числа носителей по каждой области. Расчетное число хронических носителей (ХН) авторами сопоставлено с числом хронических бактерионосителей, состоящих на учете в СЭС на 01.01.1980. Эти данные приведены в таблице.

На основании представленных данных 1980-х гг. авторы заключают, что удовлетворительно было поставлено выявление хронических бактерионосителей только в г. Ташкенте и Ферганской области. Без учета этих данных в республике, как минимум, не учтено более 2200 хронических бактерионосителей возбудителей брюшного тифа и паратифа В. Это положение сложилось в результате недостаточно серьезного подхода практического здравоохранения к выявлению таких важных эпидемиологических критериев, как источник и резервуар инфекции брюшного тифа и паратифов, как хронические бактерионосители, хотя существующие методы лабораторной диагностики их хорошо известны. Это упущение должно быть ликвидировано. Можно полагать, что фактическое число хро-

Таблица. Данные о хронических носителях брюшного тифа

№ пп	Наименование областей	Минимальное количество ХН, которые должны состоять на учете (расчетное число)	Число ХН, состоящих на учете в СЭС на 01.01.1980*	Число ХН, состоящих на учете в СЭС на 01.01.2023**
1	Ташкентская	388	137	19
2	Андижанская	305	52	41
3	Бухарская	383	128	112
4	Самаркандская	587	140	582
5	Сырдарьинская	70	10	0
6	Кашкадарьинская	272	110	83
7	Сурхандарьинская	201	40	156
8	Ферганская	306	471	13
9	Хорезмская	125	21	2
10	Наманганская	443	163	96
11	Джизакская	30	41	39
12	г. Ташкент	246	409	36
13	Навоийская	-	-	89
14	Республика Каракалпакстан	318	21	34
	Итого	3684	1739	1302

*данные д.м.н., профессора М.В.Невского и с.н.с., к.м.н. З.М.Аминзаде [1];

**официальные данные Министерства здравоохранения РУз.

нических бактерионосителей существенно больше, так как далеко не все больные, переносящие легчайшие формы инфекции, учитываются медицинскими работниками.

А как обстоит дело с хроническими бактерионосителями через 43 года? Как представлено в таблице, на 01.01.2023 в республике состоят на учете 1302 ХН. Если учесть количество населения того периода и настоящего времени, то существенного успеха в этом вопросе нет не только в Узбекистане, но и в других странах. Необходимо учитывать, что при возникновении селей и других чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера, приводящих к вспышкам тифо-паратифозных инфекций, количество ХН будет расти.

Что же можно будет предложить в таких ситуациях? Нами разработана новая программа борьбы с брюшным тифом. Она позволяет без больших затрат ликвидировать заболевание на обширных территориях и даже в очень бедных странах. Базовым ее элементом является применение нового очищенного вакцинного препарата БМВ (брюшнотифозной молекулярной вакцины жидкой). Этот препарат, полученный по уникальной технологии, используют прежде всего для вакцинации здоровых людей в зоне риска. При этом иммуногенность этой вакцины существенно выше большинства брюшнотифозных вакцинирующих препаратов и в острых опытах на лабораторных животных составляет 95–100%. При вакцинации людей в широком производственном опыте (более 10 тыс. человек) не было отмечено ни одного серьезного поствакцинального осложнения и ни одного заболевшего брюшным тифом. Но самое главное, что БМВ может использоваться и как терапевтическая вакцина – для лечения микробоносителей брюшного тифа. В этом случае БМВ применяется по иной, терапевтической, схеме и включает ряд последовательных инъекций. Проведенные испытания показали, что после курса вакцинотерапии все бактерионосители оказывались свободными от инфекции. Всего же терапевтическому курсу подверглись более сотни микробоносителей [2]. Полученные результаты позволяют нам предложить новую программу борьбы с этой болезнью, которая обещает быть очень эффективной. Почему? А потому что с ее помощью удастся надежно блокировать целых два звена эпидемической цепи. При этом известно, что нейтрализация даже одного звена разрушает весь эпидемический процесс.

В качестве базовых элементов такая программа может включать:

1) широкую иммунизацию всех намеченных групп риска вакциной БМВ. Благодаря этому создаётся значительный контингент людей, невосприимчивых к заражению, что блокирует третье звено эпидцепи – «восприимчивый к инфекции организм». Этому способствует как хорошая переносимость препарата, так и невысокая его стоимость;

2) всех выявленных микробоносителей, а иногда и просто всех переболевших подвергают обработке вакциной БМВ по терапевтической схеме. Это позволит ликвидировать хроническое бактерионосительство и убрать из популяции весь источник инфекции (т.е. происходит ликвидация первого звена эпидцепи – «источника инфекции»);

3) проведение обычных санитарно-гигиенических мероприятий, установленных законодательством, предупреждающих распространения инфекции, а также расширение сани-

тарно-просветительской и образовательной работы среди населения и медицинских работников. Это будет полезным дополнением для данной программы, поскольку позволит держать под контролем «механизмы передачи» инфекции [3].

Таким образом, как минимум два из трех звеньев распространения инфекции будут надежно перекрыты. А это сделает невозможным ее развитие и сможет привести к ликвидации брюшного тифа на значительных территориях. При этом даже «производственные погрешности» (такие, как оставшиеся не выявленными бактерионосители или заболевшие невакцинированные люди не из групп риска и т.д.) не смогут существенно повлиять на процесс искоренения инфекции, поскольку блокируются главные механизмы эпидемического процесса и болезнь не сможет распространяться.

Литература

1. Невский МВ, Аминзаде ЗМ. О состоянии выявления хронических бактерионосителей возбудителей брюшного тифа и паратифов. Актуальные вопросы особо-опасных и кишечных инфекций в Узбекистане. Сборник трудов Узбекского научно-исследовательского института эпидемиологии, микробиологии и инфекционных заболеваний. 1981, с. 15-18.
2. Патент на изобретение IAP 20170193 от 30.12.2022 «Способ получения жидкой брюшнотифозной молекулярной вакцины и способ лечения (санации) хронического брюшнотифозного бактерионосительства с её применением». Ташкент, 2022, 9 с.
3. Игнатов ПЕ, Маматкулов АИ, Маматкулов ИХ. Новые возможности в создании программ борьбы с брюшным тифом. Инфекция, иммунитет и фармакология. 2019;2:83-86.

References

1. Nevsky MV, Aminzade ZM. On the state of detection of chronic bacteriocarriers of typhoid and paratyphoid pathogens. Topical issues of especially dangerous and intestinal infections in Uzbekistan. Collection of works of Uzbek Research Institute of Epidemiology, Microbiology and Infectious Diseases. 1981, pp. 15-18. (In Russian).
2. Patent for invention IAP 20170193 dated December 30, 2022 "Method for obtaining liquid typhoid molecular vaccine and method for treating (sanation) of chronic typhoid bacteriocarrier with its use". Tashkent, 2022, 9 p. (In Russian).
3. Ignatov PE, Mamatkulov AI, Mamatkulov IKh. New opportunities in the creation of programs to combat typhoid fever. Infection, Immunity and Pharmacology. 2019;2:83-86. (In Russian).

Информация о соавторах:

Игнатов Пётр Евгеньевич, доктор биологических наук, профессор, действительный член Академии Наук «Турон», президент IGN-International

Маматкулов Алишер Ибрагимович, директор СП ООО BIBINOR, младший научный сотрудник Ташкентского научно-исследовательского института вакцин и сывороток

Кудашева Людмила Владимировна, кандидат медицинских наук, начальник эпидемиологического отдела Службы санитарно-эпидемиологического благополучия и общественного здоровья Республики Узбекистан

Information about co-authors:

Peter E. Ignatov, PhD, DSc (Biological Sciences), Professor, Full Member of the Academy of Sciences «Turon», President of IGN-International USA

Alisher I. Mamatkulov, Director of JV «BIBINOR» LLC; junior research, Tashkent Research Institute of Vaccines and Serums

Lyudmila V. Kudashева, MD, PhD, Head of the Epidemiological Department of the Service for Sanitary and Epidemiological Welfare and Public Health Service of the Republic of Uzbekistan

Организация работы диагностической ковидной лаборатории на базе потенциально опасного биологического объекта

С.А.Благодатских, Е.А.Тюрин, А.Е.Курилова, М.В.Храмов

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

В работе рассматривается процесс организации диагностической ковидной лаборатории на базе потенциально опасного биологического объекта. Перед специалистами объекта была поставлена задача по проведению диагностических исследований на наличие COVID-19 в отобранном и переданном для анализа материале из регионов Московской области. Для организации работ лаборатории требовалось решить ряд организационных и профессиональных вопросов: какое помещение использовать, какие специалисты будут привлекаться к работам, каково обеспечение лаборатории соответствующим оборудованием, как сотрудники обеспечиваются защитной одеждой. Допуск персонала в рабочие помещения проводился только после приказа и ежедневного предварительного медицинского осмотра и термометрии, что позволяло оперативно исключать из коллектива носителей инфекции и минимизировать риски ее распространения. Полученный опыт позволил переосмыслить организацию временных лабораторий, выявить слабые места в работе коллектива при быстром репрофилировании работ с патогенными биологическими агентами, а также разработать меры по безопасности и применять на практике способы решения проблем нераспространения инфекции.

Ключевые слова: коронавирус, диагностическая лаборатория, биологическая безопасность, организация работ

Для цитирования: Благодатских С.А., Тюрин Е.А., Курилова А.Е., Храмов М.В. Организация работы диагностической ковидной лаборатории на базе потенциально опасного биологического объекта. Бактериология. 2023; 8(1): 62–65. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-62-65

Organization of the work of a covid diagnostic laboratory on the basis of a potentially hazardous biological facility

S.A.Blagodatskikh, E.A.Tyurin, A.E.Kurilova, M.V.Khramov

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

The paper considers a process for organizing a diagnostic COVID laboratory based on a potentially dangerous biological object. The specialists of the facility were tasked with conducting diagnostic tests for the presence of COVID-19 in the selected and transferred for analysis material from the regions of the Moscow region. To organize the work of the laboratory, it was necessary to solve a number of organizational and professional issues: which room to use, which specialists will be involved in the work, what is the provision of the laboratory with appropriate equipment, how employees are provided with protective clothing. Admission of personnel to the working premises was carried out only after the order and daily preliminary medical examination and thermometry, which made it possible to quickly exclude carriers of the infection from the team and minimize the risks of its spread. The experience gained made it possible to rethink the organization of temporary laboratories, to identify weaknesses in the work of the team during the rapid re-profiling of work with the PBA, as well as to develop safety measures and apply in practice ways to solve the problems of non-spread of infection.

Key words: coronavirus, diagnostic laboratory, biological safety, organization of work

For citation: Blagodatskikh S.A., Tyurin E.A., Kurilova A.E., Khramov M.V. Organization of the work of a covid diagnostic laboratory on the basis of a potentially hazardous biological facility. Bacteriology. 2023; 8(1): 62–65. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-62-65

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 область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0016

Статья поступила 23.01.2023, принята к печати 28.04.2023

For correspondence:

Eugeny A. Tyurin, MD, PhD, Senior Researcher, Leading Researcher of the Laboratory of Biological Safety, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0016

The article was received 23.01.2023, accepted for publication 28.04.2023

Стремительно развивающаяся в 2020–2021 гг. пандемия коронавируса SARS-CoV-2 поставила перед медицинским сообществом России ряд проблем, которые нужно было решать быстро и качественно. Одна из таких проблем – быстрое развертывание ковидных диагностических лабораторий на базе научно-исследовательских институтов медико-биологического профиля Роспотребнадзора, являющихся потенциально опасными биологическими объектами (ПОБО) с лабораториями изолированного и максимально изолированного уровней (УББ 3–4) для оказания помощи практическому здравоохранению во время резкого ухудшения эпидемиологической обстановки в стране. Именно такая задача и была поставлена перед дирекцией и сотрудниками ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора в марте 2020 г.: развернуть лабораторию и организовать прием материала от населения с подозрением на заболевание коронавирусной инфекцией, проводить диагностические исследования полученного материала, используя реакцию амплификации, и оперативную выдачу результатов на время пандемии COVID-19.

Ранее в ГНЦ ПМБ с возбудителями вирусных инфекционных заболеваний не работали. И в этом состояла дополнительная сложность, так как в материале, передаваемом для исследования, мог содержаться вирус SARS-CoV-2, относящийся ко II группе патогенности [1]. Сложность была обусловлена не только возможным наличием вируса в материале, но и тем, что подготовленных специалистов-вирусологов, допущенных к работам с патогенными биологическими агентами (ПБА) и имеющих опыт работ с вирусами, в штате Центра были единицы. Кроме того, в основном лабораторном корпусе не было свободных помещений, предназначенных или аттестованных для данного вида работ.

COVID-19 (COronaVirus Disease 2019 – коронавирусная инфекция 2019 г., рус. ковид) – потенциально тяжелая острая респираторная инфекция, вызываемая оболочечным одноцепочным (+) РНК-вирусом SARS-CoV-2 (2019-nCoV), относящимся к вирусам II группы патогенности (опасности) [1, 2]. Распространяется вирус воздушно-капельным путем через вдыхание распыленных в воздухе при кашле, чихании или разговоре капель, а также через попадание на поверхности с последующим занесением в глаза, нос или рот [3]. Заболевание может протекать как в форме острой респираторной вирусной инфекции легкого течения, так и в тяжелой форме. К наиболее распространенным симптомам заболевания относят повышенную температуру тела, утомляемость и сухой кашель. Вирус способен поражать различные органы и системы через прямое инфицирование. Тяжелые формы болезни с большей вероятностью могут развиваться у пожилых людей и у людей с определенными сопутствующими заболеваниями, включая астму, диабет и сердечные заболевания.

Диагностическое тестирование на SARS-CoV-2 является важным компонентом общей стратегии профилактики COVID-19 и борьбы с ним, а также в последующем увеличивает процент положительного течения заболевания и уменьшение сопутствующих проявлений болезни. В основе этиологической диагностики вирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, лежит выявление РНК SARS-CoV-2 методом реакции амплификации или полимеразной цепной реакции (ПЦР) [4, 5]. Скорость выполнения исследований определя-

ется технологией ПЦР и составляет в среднем 4 ч для постановки одной реакции.

Цель. Оценить порядок быстрого реагирования на чрезвычайную ситуацию на примере организации лаборатории для проведения диагностических исследований методом ПЦР материалов, подозрительных на содержание коронавируса. на базе ПОБО и проанализировать проблемы и их решения.

Результаты и обсуждение

С первых же дней начала распространения новой коронавирусной инфекции по территории России в марте 2020 г. перед сотрудниками Центра руководством Роспотребнадзора была поставлена задача проведения диагностических исследований методом ПЦР на наличие маркеров SARS-CoV-2 в отобранном и переданном для анализа материале, поступающем из регионов Московской области. Материал, доставляемый для анализа, представлял собой мазок, отобранный из ротоглотки обследуемых людей разного пола и возраста.

Для выполнения поставленных задач по диагностике COVID-19 руководством ГНЦ ПМБ было принято решение о создании временной диагностической лаборатории. При ее создании опирались на нормативно-методическую базу: санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» [6] и методические указания «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» [7]. Согласно этим документам были разработаны внутренние правила работ с материалом, подозрительным на содержание нового коронавируса.

Для организации работ требовалось решить следующие вопросы:

- определить рабочие помещения в «заразной» зоне основного лабораторного корпуса, соответствующие требованиям биологической безопасности, обеспеченные необходимым оборудованием;
- уточнить список сотрудников, допущенных к работам с ПБА I–II групп и подготовить приказ о допуске их к работам в соответствующих функциональных зонах;
- определить количество и объем обеспечения рабочей и защитной одеждой, средствами защиты органов дыхания, дезинфектантами.

Отдельные требования предъявлялись к проведению текущей и заключительной дезинфекции «заразной» зоны лаборатории, обеззараживанию рабочей и защитной одежды на границах зон, обеззараживанию материала и других твердых отходов из «заразной» зоны, а также к контролю качества проводимых исследований.

В лабораторной «заразной» зоне ГНЦ ПМБ был выбран отдельный блок помещений, расположенный на одном из этажей основного лабораторного корпуса с отдельным входом. Технически блок полностью соответствовал требованиям биологической безопасности для работы с ПБА II группы и материалом, подозрительным на их содержание. Помещения блока позволяли провести полный цикл диагностики от получения, разбора и подготовки материала, про-

ведения диагностической ПЦР до выдачи результатов в виде протоколов. В соответствии с этим были созданы следующие функциональные зоны:

- приема и разбора проб;
- выделения биоматериала из полученных проб;
- проведения реакции амплификации и анализа полученных результатов.

Для нормального функционирования отдельного блока лабораторных помещений «заразной» зоны в нем был предусмотрен разнополюс санитарный пропускник с помещениями для надевания и снятия рабочей одежды, помещениями гигиенического душа, помещениями камеры для обеззараживания рабочей и защитной одежды на границе зон, помещением для проведения обеззараживания твердых отходов путем автоклавирования (+132°C, 2 атм., 120 мин). В каждом предбоксе блока осуществлялся слив жидких отходов из в систему тепловой обработки стоков с режимом обеззараживания +142°C, 6 атм., 40 мин с последующим сбросом их после охлаждения до +40°C в объектовую канализацию. Все помещения «заразной» зоны блока были обеспечены отдельной механической приточно-вытяжной системой вентиляции, создающей разрежение 100–150 Па в рабочих помещениях «заразной» зоны, оборудованной высокоэффективными фильтрами тонкой очистки воздуха на притоке и вытяжке типа ФЭТО-750 класса Н14. Работы с материалом проводили в аттестованных (сертифицированных) боксах микробиологической безопасности II–III классов.

Немаловажным этапом подготовки проведения диагностических работ в лаборатории стал подбор сотрудников из штата учреждения для привлечения к работам с материалом, подозрительным на содержание коронавируса. Согласно действующим санитарно-эпидемиологическим правилам [2, 6] допуск к таким работам возможен только в отношении специально подготовленного персонала, поэтому в срочном порядке были проведены курсы повышения квалификации с последующим инструктажем о правилах работы в учреждении с ПБА II группы для сотрудников, которые привлекались к работам впервые с последующей сдачей зачета по знанию требований биологической безопасности и правилам работы в зоне. Для тех сотрудников, которые уже прошли курсы профессиональной подготовки и курсы повышения квалификации, был проведен внеочередной инструктаж по биологической безопасности и правилам противозидемического режима при работе с подозрительным материалом, содержащим возбудители II группы патогенности. После этого были сформированы группы согласно рабочим зонам, и их состав был закреплен приказом директора.

Отдельно были сформированы рабочие группы по вспомогательной деятельности: закупка и доставка расходных материалов и оборудования, проведение сбора, обеззараживания и уничтожения твердых отходов. Так как работы велись круглосуточно, был выделен служебный транспорт для доставки персонала в ночное время на работу и домой.

Персонал, допущенный к работе с материалом, ежедневно проверяли на наличие COVID-19 (брали мазок из ротоглотки). В случае положительного ПЦР-теста сотрудника изолировали дома под наблюдение специалистами ФГБУЗ «МСЧ №164» ФМБА России. Ежедневный допуск

персонала в рабочие помещения лаборатории, согласно санитарно-эпидемиологическим правилам при работе с ПБА II группы [2, 6], проводили только после предварительного медицинского осмотра и термометрии, что позволяло оперативно исключать из коллектива носителей инфекции и минимизировать риски ее распространения.

Для уменьшения перекрестного заражения среды рабочей зоны и неправильной интерпретации результатов строго соблюдали направленность потоков материалов: максимально старались исключить пересечение потоков входящих проб и передающихся уже на конечное исследование. Помещения для выделения РНК вируса и для постановки диагностических исследований были физически разделены. В них работали разные сотрудники и передача материала происходила только в виде обеззараженных укладок через передаточные окна, чтобы максимально исключить передачу в помещение постановки ПЦР неконтролируемых образцов РНК. Пробы передавались через передаточные окна однонаправленного действия, только внутрь. Во время получения материала и первичного разбора другие работы, не связанные с диагностикой заболевания, не велись. После проведения следующих этапов работы (получение проб, разбор проб, выделение РНК и постановка ПЦР) проводилась обработка помещений ультрафиолетовым облучением, а в конце смены – влажная уборка с применением дезинфицирующих средств [8].

Кроме работ, непосредственно связанных с диагностикой наличия COVID-19, в учреждении проводились дополнительные мероприятия по уменьшению рисков распространения инфекции в коллективе. Было рекомендовано уменьшить перемещение сотрудников между научными подразделениями, по возможности вести научную деятельность и общение с коллегами «удаленными методами»: электронная почта, сотовая связь. До сотрудников доводились рекомендации и информационные письма Роспотребнадзора, касающихся характера распространения вирусной инфекции и симптомов заболевания, рекомендации при посещении общественных мест, рекомендации по личной гигиене, порядке обращения за медицинской помощью (при необходимости). Мероприятия по обеспечению биологической безопасности были также проведены в отношении сотрудников старше 60 лет, не занятых в работе ковидной лаборатории, по ограничению их присутствия на рабочих местах в корпусе.

Руководство постоянно обеспечивало всех сотрудников ГНЦ ПМБ средствами индивидуальной защиты органов дыхания и жидкими средствами для обеззараживания рук. Места возможного скопления людей при входе, у лифтов и т.п. обеззараживали дезинфицирующими средствами против вирусной инфекции. Для раннего выявления очагов возможного распространения инфекции проводились выборочные заборы материала для диагностики на COVID-19 от сотрудников, не входящих в функциональные группы, но находящихся в корпусе и Центре. При появлении первых российских вакцин против COVID-19 была проведена массовая вакцинация сотрудников.

Благодаря такому решению все работы по диагностике COVID-19 проходили независимо от основных работ учреждения. Контроль соблюдения требований биологической безопасности при проведении работ на всех этапах исследо-

вания осуществляли специалисты лаборатории биологической безопасности, включенные в состав функциональных групп.

Результатом проведения этих мероприятий явилась возможность проведения лабораторных анализов по выявлению коронавирусной инфекции на уровне до 1500 проб в сутки. Удалось избежать массового распространения вирусной инфекции среди сотрудников. За период работы лаборатории ГНЦ ПМБ с 2020 г. по настоящее время было исследовано более 230 000 проб. Поскольку в данный момент актуальность экспресс-диагностики коронавирусной инфекции не пропала, лаборатория продолжает функционировать. В ее работу регулярно вносятся актуальные изменения, вызванные новыми требованиями биологической безопасности и новыми задачами [8], которые ставит перед сотрудниками руководство организации и федеральной службы.

Полученный опыт позволил глубже осмыслить порядок организации временных лабораторий при чрезвычайных ситуациях эпидемического характера, выявить слабые места в работе коллектива при быстром перестроении профиля работ, а также разработать и применять на практике способы решения этих проблем.

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 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. Информационное письмо Руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) Поповой А.Ю. от 06.03.2020 № 02/3739-2020-32.
2. СП 3.3685-21. Санитарные нормы и правила «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», 2021, 1092 с.
3. Roberts DL, Rossman JS, Jarić I. Dating first cases of COVID-19. *PLoS Pathog.* 2021 Jun 24;17(6):e1009620. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009620
4. Guaman-Bautista LP, Moreta-Urbano E, Oña-Arias CG, Torres-Arias M, Kyriakidis NC, Malcı K, et al. Tracking SARS-CoV-2: Novel Trends and Diagnostic Strategies. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Oct 26;11(11):1981. DOI: 10.3390/diagnostics11111981
5. Safiabadi Tali SH, LeBlanc JJ, Sadiq Z, Oyewunmi OD, Camargo C, Nikpour B, et al. Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. *Clin Microbiol Rev.* 2021 May 12;34(3):e00228-20. DOI: 10.1128/CMR.00228-20

6. СП 1.3.3118-13 Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)», 2013,195 с.
7. МУ 1.3.2569-09. «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».
8. Волынкина АС, Рязанова АГ, Русанова ДВ, Куличенко АН. Проблема ДНК(РНК)-контаминации в лаборатории при проведении диагностики COVID-19 методом ПЦР. *Здоровье населения и среда обитания.* 2021;7:76-81. DOI: 10.35627/2219-5238/2021-29-7-76-81

References

1. Information letter from the Head of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor) Popova A.Yu. 06.03.2020 № 02/3739-2020-32. (In Russian).
2. SP 3.3685-21. Sanitary norms and rules "Sanitary and epidemiological requirements for the prevention of infectious diseases", 2021, 1092 p. (In Russian).
3. Roberts DL, Rossman JS, Jarić I. Dating first cases of COVID-19. *PLoS Pathog.* 2021 Jun 24;17(6):e1009620. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009620
4. Guaman-Bautista LP, Moreta-Urbano E, Oña-Arias CG, Torres-Arias M, Kyriakidis NC, Malcı K, et al. Tracking SARS-CoV-2: Novel Trends and Diagnostic Strategies. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Oct 26;11(11):1981. DOI: 10.3390/diagnostics11111981
5. Safiabadi Tali SH, LeBlanc JJ, Sadiq Z, Oyewunmi OD, Camargo C, Nikpour B, et al. Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. *Clin Microbiol Rev.* 2021 May 12;34(3):e00228-20. DOI: 10.1128/CMR.00228-20
6. СП 1.3.3118-13 Sanitary and epidemiological rules "Safety of work with microorganisms of I–II groups of pathogenicity (danger)", 2013,195 p. (In Russian).
7. МУ 1.3.2569-09. "Organization of work of laboratories using methods of amplification of nucleic acids when working with material containing microorganisms of pathogenicity groups I–IV". (In Russian).
8. Volynkina AS, Ryzanova AG, Rusanova DV, Kulichenko AN. The problem of DNA/RNA contamination in the laboratory during PCR testing for COVID-19. *Public Health and Life Environment.* 2021;7:76-81. DOI: 10.35627/2219-5238/2021-29-7-76-81 (In Russian).

Информация о соавторах:

Благодатских Станислав Александрович, младший научный сотрудник лаборатории биологической безопасности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Курилова Александра Евгеньевна, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Храмов Михаил Владимирович, кандидат медицинских наук, заместитель директора по качеству и развитию ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Stanislav A. Blagodatskikh, Junior Researcher of the Laboratory of Biological Safety, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Alexandra E. Kurilova, Junior Researcher, Department of Collection Cultures, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Mikhail V. Khramov, MD, PhD, Deputy Director for Quality and Development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

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 используются 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.,

Серпуховский р-н, п. Оболенск, ГНЦ ПМБ

Тел. (4967) 36-00-46

Факс (4967) 36-00-10

E-mail: info@obolensk.org

или

bacteriology@obolensk.org