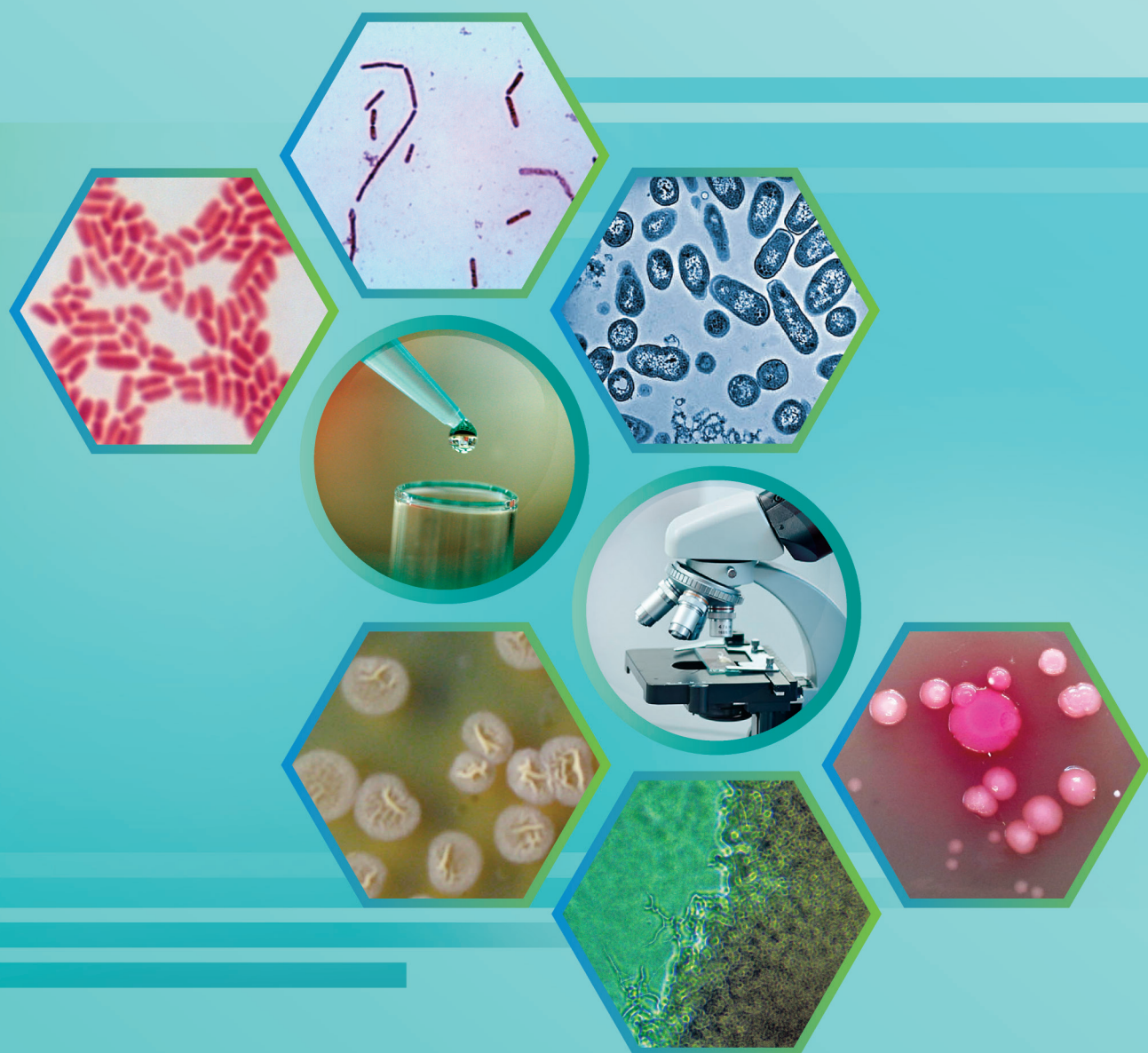


БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2023 • том 8 • №2

ISSN 2500-1027

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Н а у ч н о - п р а к т и ч е с к и й ж у р н а л

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 30.06.2023 г.

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

Журнал зарегистрирован
Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)
Регистрационный номер
П/И №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

- Биологические структуры для конструирования средств доставки лекарственных препаратов
и вакцин к клеткам-мишеням **5**

Экспериментальные статьи

- Алгоритм разработки и характеристика диагностических латексных тест-систем,
производимых в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии (часть 1)
Э.А.Светоч, Б.В.Ерусланов, И.П.Мицевич, М.В.Храмов, Е.С.Перескокова, Н.К.Фурсова **8**
- Оценка качества отечественных питательных сред для культивирования термофильных кампилобактерий
О.В.Полосенко, Л.П.Домотенко, И.С.Косилова, М.В.Храмов **20**
- Детекция и типирование боррелий в Тульской области.
Сообщение 1. Клещи, снятые с людей
Т.В.Решетняк, И.Ю.Щит, С.Ф.Бикетов, И.Г.Говорунов, Т.В.Козлова, А.В.Фольмер **27**
- Совершенствование сублимационной сушки холерных диагностических сывороток в ампулах
А.В.Комиссаров, С.А.Бадарин, Д.Н.Бибилов, Н.В.Синицына, Н.И.Костылева,
Е.А.Глазкова, А.С.Феськова, М.В.Овчинникова, А.К.Никифоров **34**
- Антибактериальные свойства комплексов оксидов различных металлов
в отношении *Pseudomonas aeruginosa* и их цитосовместимость
Е.М.Гордина, С.А.Божкова, Д.В.Лабутинов, А.А.Ерузин, М.В.Богма **42**
- Учебные штаммы бруцелл для профессиональной переподготовки бактериологов,
эпидемиологов и лаборантов
Т.П.Шмелькова, Т.А.Малюкова, Г.В.Чеховская, Н.А.Осина, В.Г.Германчук, Ю.А.Попов **49**
- Доклинические испытания безопасности применения
и иммуногенности брюшнотифозной молекулярной вакцины
А.И.Маматкулов, П.Е.Игнатов **56**
- Показатели эпидемической обстановки по Конго-Крымской геморрагической лихорадке
в республике Узбекистан
Г.Х.Раджабов, У.И.Абдурахманов, З.И.Бердиева, М.С.Хакимова **60**

Обзорные статьи

- Photobacterium* spp.: от симбиоза к паразитизму
Н.А.Липатникова, С.В.Дентовская **64**
- Патогенетический потенциал *Vibrio vulnificus* как возбудителя септических инфекций
С.Ю.Темякова, Р.В.Писанов, Е.В.Ступникова **72**
- Оценка состояния профессиональной подготовки для снижения биологических рисков
у сотрудников ветеринарных испытательных лабораторий
Е.А.Тюрин, С.А.Благодатских, П.С.Квачко **79**
- Правила оформления статей (основные положения) **83**

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

Biological structures for designing means for delivering drugs and vaccines to target cells	5
---	---

Experimental Articles

The algorithm for the development and characterization of diagnostic latex test-systems produced at the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology (part 1) <i>E.A.Svetoch, B.V.Eruslanov, I.P.Mitsevich, M.V.Khramov, E.S.Pereskokova, N.K.Fursova</i>	8
Evaluation of Russia-made nutrient media for culturing thermophilic <i>Campylobacter</i> <i>O.V.Polosenko, L.P.Domotenko, I.S.Kosilova, M.V.Khramov</i>	20
Detection and typing of <i>Borrelia</i> in the Tula region. Message 1. Ticks that bit people <i>T.V.Reshetnyak, I.Yu.Shchit, S.F.Biketov, I.G.Govorunov, T.V.Kozlova, A.V.Folmer</i>	27
Improvement freeze-drying of diagnostic cholera sera in ampoules <i>A.V.Komissarov, S.A.Badarin, D.N.Bibikov, N.V.Sinitsyna, N.I.Kostyleva, E.A.Glazkova, A.S.Fes'kova, M.V.Ovchinnikova, A.K.Nikiforov</i>	34
Complexes of various metals oxides: antibacterial properties of against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and cytocompatibility <i>E.M.Gordina, S.A.Bozhkova, D.V.Labutin, A.A.Eruzin, M.V.Bogma</i>	42
Practice strains of brucella for professional retraining of bacteriologists, epidemiologists and laboratory assistants <i>T.P.Shmelkova, T.A.Malyukova, G.V.Chekhovskaya, N.A.Osina, V.G.Germanchuk, Yu.A.Popov</i>	49
Safety of the typhosis molecular vaccine <i>A.I.Mamatkulov, P.E.Ignatov</i>	56
Indicators of the epidemic situation in the Crimean-Congo hemorrhagic fever in the republic of Uzbekistan <i>G.H.Radzhabov, U.I.Abdurakhmanov, Z.I.Berdieva, M.S.Khakimova</i>	60

Review Articles

<i>Photorhabdus</i> spp.: from symbiosis to parasitism <i>N.A.Lipatnikova, S.V.Dentovskaya</i>	64
Pathogenetic potential of <i>Vibrio vulnificus</i> as a causative agent of septic infections <i>S.Yu.Temyakova, R.V.Pisanov, E.V.Stupnikova</i>	72
Assessment of the state of professional training to reduce biological risks in staff of veterinary testing laboratories <i>E.A.Tyurin, S.A.Blagodatskikh, P.S.Kvochko</i>	79
Instructions for Authors	83

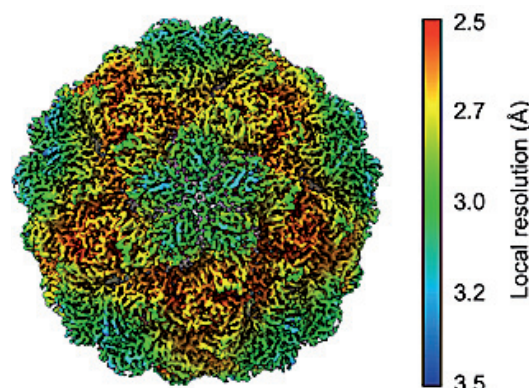
Биологические структуры для конструирования средств доставки лекарственных препаратов и вакцин к клеткам-мишеням

С развитием нанотехнологий частицы соответствующих размеров стали изучаться на предмет возможности использования для доставки лекарственных средств, в т.ч. вакцинных препаратов, в органы-мишени. Хотя, в строгом понимании, к наночастицам относят искусственно созданные элементы, к этой группе можно отнести и биологические структуры, пригодные как для инкапсулирования отдельных лекарственных или иммунодоминантных веществ, так и для их размещения на поверхности с использованием различных типов сил связывания. В этих целях в основном применяют липосомальные, неорганические, полимерные, белковые и мицеллиальные наночастицы.

Биосинтез биологических наноразмерных частиц кодируется геномом организма, поэтому они могут быть получены с высокой степенью воспроизводимости, имеют значительные по площади внутренние и внешние поверхности для связывания, достаточно низкую стоимость при получении в больших количествах, в отличие от химического синтеза.

В своих разработках ФБУН ГНЦ ПМБ уже использовал микрочастицы для конструирования вакцин на основе рекомбинантных антигенов. В частности, была разработана, запатентована и зарегистрирована вакцина против чумы на основе микрокапсулирования антигенов чумного микроба – капсульного и V. Хотя эта вакцина (первая из созданных в России для данных целей) обеспечивала достаточно приемлемый уровень протективности, но он не достигал и 50% от такового живой чумной вакцины. В связи с этим мы обратили внимание на некоторые другие перспективные частицы, в основном биологического происхождения, для осуществления эффективного инкапсулирования или адсорбирования антигенов. Одна из таких технологий, частично описанная ранее (колонки главного редактора журнала, №№ 2 и 3 за 2022 г.), основана на использовании теней бактериальных клеток.

Бактериальные тени представляют собой оболочки грамотрицательных бактерий, утратившие клеточное содержимое, не имеющие нуклеиновых кислот и других внутриклеточных компонентов. Наиболее применяемым методом получения бактериальных теней является экспрессия различных генов лизиса из природных или синтетических фагов энтеробактерий в грамотрицательных бактериях. В качестве примера можно привести кодируемый фагом эндолизин, который частично разрушает пептидогликановый слой (действует как пептидогликангидролаза), что приводит к формированию пор в бактериальной мембране и выходу клеточного содержимого за пределы оболочки. Уже имеются сообщения о получении бактериальных теней *S. Typhimurium*, *S. enteritidis*, *V. cholerae*, *H. pylori*, *H. influenzae*, *Brucella* и определены возможности их использования для создания вакцинных препаратов. Также была показана перспективность совмещения платформ для разработки вакцин, когда используются и бактериальные тени, и фрагменты ДНК, несущие гены значимых в иммуногенезе антигенов.



Эффективность использования бактериальных теней заключается в том, что они сохраняют на клеточной поверхности различные собственные структуры патогена – полисахаридные, белковые, в т.ч. мембранные, протеины, обладающие протективными свойствами. Невозможно создавать бактериальные вакцины, конструируя коктейли из множества значимых в иммуногенезе бактериальных антигенов, так как это весьма затратно с точки зрения и стоимости разработки, и процесса производства препаратов. Выходом из ситуации как раз и является использование бактериальных теней патогенов, нагруженных оптимально двумя-тремя мажорными антигенами.

Например, установлено, что при введении вакцинного штамма *Y. pestis* EV развивается гуморальный иммунный ответ более чем на 50 антигенов чумного микроба. Для кроликов иммунодоминантными являются 13 белков (Caf1, LcrV, YscB, LcrG, YopD, VirG, PsaA, OmpA, MlpA, KatY, а также белки бактериофагов, кодируемые генами *YPO2093*, *YPO2113* и *YPO2118*). Однако мажорными антигенами в иммуногенезе являются только F1 (Caf1) и V (LcrV). Все остальные антигены могут присутствовать в вакцинном препарате в интегрированном виде с тенями клеток, что и использовано в новой трехкомпонентной вакцине, показавшей высокую эффективность, и позволило выйти в текущем году на доклинические испытания препарата.

Перспективными элементами для конструирования, сходными с бактериальными тенями, являются везикулы внешних мембран бактериальной клетки грамотрицательных бактерий, которые выделяются в окружающую среду из клеточной стенки бактерий. Функцией везикул является сохранение выживаемости бактерий с помощью ингибирования антимикробных пептидов, удаление бактериальных отходов, таких как неправильно свернутые и стрессовые молекулы, перенос генов, передача факторов вирулентности и патогенности в клетки-мишени, защита от фагов и, возможно, модуляция иммунного ответа (адъювантные свойства).

Как и бактериальные тени, везикулы несут бактериальные антигены, интегрированные в мембрану, – белки внешней мембраны, которые могут вызывать ответы Т-клеток, например на CD8⁺, а также патоген-ассоциированные молекулярные структуры, такие как липополисахариды, способные стимулировать врожденный иммунный ответ. Везикулы в препаративных количествах выделяют из культуральной жидкости, куда они попадают в процессе культивирования, особенно глубоинного с активным перемешиванием, использованием детергентов, например дезоксихолата, обработкой ультразвуком и др.

В мире существуют четыре зарегистрированные вакцины на основе бактериальных везикул против бактерий *Neisseria meningitidis* серогруппы В (Bexsero/4CMenB, VA MENGOCCBC, MenBVac, MeNZB). Для других серогрупп нейсерий наиболее эффективны полисахаридные конъюгированные вакцины. Иммунодоминантными антигенами в вакцинах на основе везикул против *N. meningitidis* стали белки внешней мембраны: порин А (PorA), антиген, связывающий гепарин *Neisseria* (NHBA), белок, связывающий F-фактор человека (fHbp), и адгезин А *Neisseria* (NadA). Такой подход, также как для вакцин против чумы, оказался наиболее эффективным, хотя для разработки, включая идентификацию ключевых антигенов и выяснение их роли в иммуногенезе, потребовалось значительное время.

Появились также сообщения об использовании везикул для создания прототипов вакцин при переносе гетерологичных антигенов. Например, везикулы из псевдотуберкулеза использованы для доставки антигена синегнойной палочки. Везикулы сальмонелл индуцируют ответы CD4⁺ Т-клеток и выработку антител у мышей, что защищает их от заражения. Иммунизация мышей везикулами шигелл индуцировала выработку специфических антител и защищала животных от летального заражения. Предпринимались попытки использовать везикулы для вакцинации против холеры, коклюша, туберкулеза, хламидийной инфекции, сифилиса, пневмококковых пневмоний, инфекций, вызванных ацинетобактером и клебсиеллами, и даже некоторых вирусных инфекций.

На наш взгляд, для конструирования бактериальных вакцин, если выбирать между тенями клеток и везикулами, первые представляются наиболее перспективными. Во-первых, тени клеток можно получать в больших количествах из биомассы высокой плотности, хотя и для получения штамма-продуцента потребуется ряд достаточно сложных генетических манипуляций. Это в дальнейшем окупается, если речь идет о коммерческом выпуске вакцины. Получить большое количество везикул в производственном процессе – гораздо более сложная задача. Во-вторых, тени намного более стабильны, устойчивы к внешним воздействиям по сравнению с везикулами, что важно для вакцинных производств. В-третьих, тени намного проще стандартизировать по размеру, показателям содержания ключевых антигенов, осуществляя контроль физическими, оптическими и электрооптическими методами, с помощью стандартного образца сыворотки, содержания консервативных молекул (например, липополисахаридов).

Существует также относительно новый класс биологических структур бактериального происхождения, перспективный в качестве платформы для доставки терапевтических средств и вакцин. Это так называемые наноконпартаменты, или инкапсулины, представляющие собой белковые капсидоподобные комплексы с высокой молекулярной массой и регулярной структурой. Выявлено множество наноконпартаментов в зубактериях и археях, в которые включены так называемые грузовые белки, выполняющие различные функции; в т.ч. в них выявлены жизненно важные для клетки ферменты. Основными функциями инкапсулинов считаются накопление различных веществ, в т.ч. питательных в условиях голодания клеток, и возможность депонировать железо, выполняя функции вторичной ферритиновой системы и защищая клетку от действия образующегося токсичного гидроксильного радикала. Инкапсулины в основном располагаются в цитоплазме клеток и частично в культуральной жидкости, по-видимому, в результате лизиса части бактерий в популяции.

С учетом того, что наноконпартаменты высокоустойчивы к протеазам и высокостабильны, обладают развитыми внешней и внутренней поверхностями, существует реальная перспектива их использования для доставки лекарств. Генетическая или биохимическая модификация поверхности позволяет создавать конструкции, которые специфически связываются с целевыми клетками, что уже используется в модельных экспериментах по лечению онкологических заболеваний. При создании вакцин в инкапсулин может быть помещен иммунодоминантный белок, на который вырабатываются антитела (показано на белке M2 вируса гриппа), а сами структуры могут проникать в макрофаги, оставаясь там неповрежденными длительное время. Для решения таких задач необходимо развивать направление, связанное с генетическим детерминированием синтеза наноконпартаментов для целенаправленного их создания с заданными свойствами, а также технологии включения в данные структуры компонентов вакцин. Оценивая нарастающее количество научных работ по данному направлению, следует рассчитывать на появление в ближайшее время прикладных исследований по разработке прототипов носителей лекарственных средств на основе инкапсулинов.

Тени бактериальных клеток, везикулы и наноконпартаменты – это только часть биологических компонентов, перспективных для конструирования современных средств специфической профилактики инфекционных болезней. Но используя уже эти, достаточно хорошо изученные структуры, можно считать, что у нас есть предмет выбора для решения такой сложной задачи, как создание эффективных бактериальных вакцин.

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

Алгоритм разработки и характеристика диагностических латексных тест-систем, производимых в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии (часть 1)

Э.А.Светоч, Б.В.Ерусланов, И.П.Мицевич, М.В.Храмов, Е.С.Перескокова, Н.К.Фурсова

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

В статье описан предложенный авторами алгоритм разработки латексных диагностикумов для быстрой идентификации бактериальных патогенов. С использованием предложенного алгоритма получены и охарактеризованы две латексные тест-системы для идентификации возбудителя легионеллеза *Legionella pneumophila* серотип 1 и возбудителей гнойных бактериальных менингитов *Haemophilus influenzae* тип b, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* типы A, B, C и W135. Разработанные латексные тест-системы обладают 100%-й чувствительностью и специфичностью 96,5–98,5%. Обе тест-системы зарегистрированы в Российской Федерации и успешно используются в лабораторной диагностической практике.

Ключевые слова: алгоритм, латексные частицы, сенсibilизация, пептидная связь, стрептавидин-биотиновая связь, латексный диагностикум, чувствительность, специфичность

Для цитирования: Светоч Э.А., Ерусланов Б.В., Мицевич И.П., Храмов М.В., Перескокова Е.С., Фурсова Н.К. Алгоритм разработки и характеристика диагностических латексных тест-систем, производимых в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии (часть 1). Бактериология. 2023; 8(2): 8–19. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-8-19

The algorithm for the development and characterization of diagnostic latex test-systems produced at the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology (part 1)

E.A.Svetoch, B.V.Eruslanov, I.P.Mitsevich, M.V.Khramov, E.S.Pereskokova, N.K.Fursova

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

The algorithm for the development of latex test-systems for rapid identification of bacterial pathogens is described in the paper. We present two latex test-systems: (1) for identification of *Legionella pneumophila* serotype 1, a causative agent of legionellosis, and (2) for identification of *Haemophilus influenzae* type b, *Streptococcus pneumoniae*, and *Neisseria meningitidis* types A, B, C, and W135, the causative agents of purulent meningitis. These latex test-systems characterized in 100% sensitivity and 96.5–98.5% specificity. Both test-systems were registered in the Russian Federation, they are successfully used in the laboratory practice.

Key words: algorithm, latex particles, sensitization, peptide binding, streptavidin-biotin binding, latex test-system, sensitivity, specificity

For citation: Svetoch E.A., Eruslanov B.V., Mitsevich I.P., Khramov M.V., Pereskokova E.S., Fursova N.K. The algorithm for the development and characterization of diagnostic latex test-systems produced at the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology (part 1). Bacteriology. 2023; 8(2): 8–19. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-8-19

Для корреспонденции:

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

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (496) 360-079
E-mail: fursova@obolensk.org

Статья поступила 24.05.2023, принята к печати 30.06.2023

For correspondence:

Nadezhda K. Fursova, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (496) 360-079
E-mail: fursova@obolensk.org

The article was received 24.05.2023, accepted for publication 30.06.2023

Диагностические латексные тест-системы, наряду с современными иммунохимическими, иммуноферментными и молекулярно-генетическими и другими методами, в настоящее время широко используются в диагностике инфекционных заболеваний человека и сельскохозяйственных животных. На сегодняшний день известны два типа латексных диагностикумов: антительные и антигенные. Первые применяются для идентификации патогенных бактерий и грибов, вторые – для серологической диагностики бактериальных, вирусных и грибковых инфекций, а также заболеваний, вызываемых простейшими [1]. Латексные тест-системы используют также в диагностике неинфекционных заболеваний [2].

Значительное внимание и интерес специалистов к реакции латекс-агглютинации (РЛА), выполняемой на стекле, объясняется рядом ее преимуществ перед другими методами диагностики: простота постановки, быстрое получение результатов (в течение нескольких минут), отсутствие необходимости специального оборудования и возможность проведения в различных, в т.ч. полевых, условиях. РЛА обеспечивает хорошую визуализацию результата взаимодействия (склеивания) специфичных антител и корпускулярных антигенов, что позволяет сделать заключение о реакции (положительная или отрицательная), не прибегая к оценке реакции «в крестах», как это принято при учете результатов обычной реакции агглютинации (РА). Помимо указанных выше преимуществ, современные латексные тест-системы характеризуются высокими показателями чувствительности и специфичности (94–100%), что делает их весьма привлекательными и востребованными лабораторными специалистами. Важно также отметить, что для приготовления латексных диагностикумов расходуется существенно меньшее количество специфичных сывороток (иммуноглобулинов), чем при производстве диагностических агглютинирующих сывороток.

Производством латексных диагностикумов в настоящее время занимаются многие зарубежные фирмы, в том числе Oxoid (Великобритания), Hardy diagnostics (США), Microgen Bioproducts Ltd. (Великобритания), BioMerieux (Франция) и HiMedia (Индия). Как правило, в перечень производимых фирмами латексных тест-систем входят диагностикумы для идентификации наиболее часто встречающихся в инфекционной патологии бактериальных возбудителей, таких как *Haemophilus influenzae* тип b, *Neisseria meningitidis* типы A, B, C и W135, *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila* серотипа 1 и серотипов 1–15, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* и *Listeria spp.*, *Campylobacter spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, в том числе MRSA, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Clostridium difficile*, *Treponema pallidum* и др. [3]. Антигенные латексные тест-системы, производимые фирмами, предназначены для серодиагностики инфекций, вызываемых *Leptospira interrogans* (лептоспироз), вирусом *Rubella* (краснуха), *Rotavirus* (энтерит), вирусом Эпштейна–Барр (мононуклеоз), грибами *Cryptococcus* (криптококкоз), простейшими вида *Toxoplasma* (токсоплазмоз) и др. [4, 5]. Производят и широко используют в медицинской практике латексные диагностикумы также для выявления неинфекционных патологий, например для определения в крови С-реактивного белка, хорионного гонадотропина, рев-

матоидного фактора, определения групп крови и других целей [6].

В Российской Федерации производство диагностических латексных тест-систем для идентификации патогенов и серодиагностики инфекционных заболеваний пока развито слабо. На сегодняшний день на российском рынке представлены латексные тест-системы фирм ЗАО «Эколаб» (<https://ekolab.ru/catalog/>), «Vital ГК Вектор» (gkvector.com), Syntest (syntest.ru/catalog/), «ДонЛаб» (donlab.ru/catalog/lateksnye_test_sistemy_1), НПО «РЕНАМ» (<http://www.renam.ru/d-dimery>), ФБУН «ГНЦ ПМБ» (<https://obolensk.org/services/nutrient-media/diagnostics/chapters/tests>).

Реакция латекс-агглютинации

РЛА является одним из вариантов обычной РА, в которой взаимодействуют два компонента – специфичные антитела и корпускулярные антигены. Это взаимодействие при постановке РЛА на стекле проявляется образованием мелких, видимых невооруженным глазом крупинок (агглютината). Впервые феномен склеивания (агглютинации) бактерий сывороткой крови животных был описан Chorrin & Kader в 1890 г., а агглютинация бактерий как специфическая реакция иммунной системы макроорганизма на патоген была продемонстрирована Gruber & Durhan в 1896 г. [7]. В этом же году Widal предложил использовать реакцию агглютинации в качестве диагностического теста при брюшном тифе [8]. В последующие годы были разработаны и стали применяться в лабораторной практике различные варианты РА: классическая пробирочная, пластинчатая (на стекле), реакции гемагглютинации и коагглютинации и др. В реакциях гемагглютинации и коагглютинации, в отличие от обычной РА, включены дополнительные компоненты – обработанные формалином эритроциты, способные иммобилизовать на своей поверхности антитела или антигены и убитые клетки специальных белок А-образующих штаммов *Staphylococcus aureus*, связывающие на своей поверхности антитела. Использование эритроцитов и клеток *S. aureus* существенно улучшило визуализацию результатов реакций и позволило повысить степень стандартизации их постановки. Недостатками эритроцитарных диагностикумов были их нестабильность и сравнительно небольшие сроки хранения [8].

В РЛА на стекле вместо эритроцитов и клеток стафилококков используют специальные, химически синтезированные, полистирольные инертные стандартизованные микросферы (латексные частицы) размером от 0,1 до 2 мкм (рис. 1), на поверхности которых иммобилизованы функционально активные химические группы (карбоксильные, аминные, альдегидные, стрептоаваидиновые и др.), способные связываться с антителами (антительные диагностикумы) или антигенами (антигенные диагностикумы).

Использование в РЛА стандартизованных активированных латексных частиц позволило кардинально улучшить два основных свойства диагностикумов – показатели чувствительности и специфичности, которые у современных латексных тест-систем сопоставимы с аналогичными показателями других диагностикумов и составляют 94–100%. Латексные диагностикумы сохраняют свою стабильность и активность в течение года и более. Высокая чувствительность и специфичность латексных диагностикумов, их стабильность при

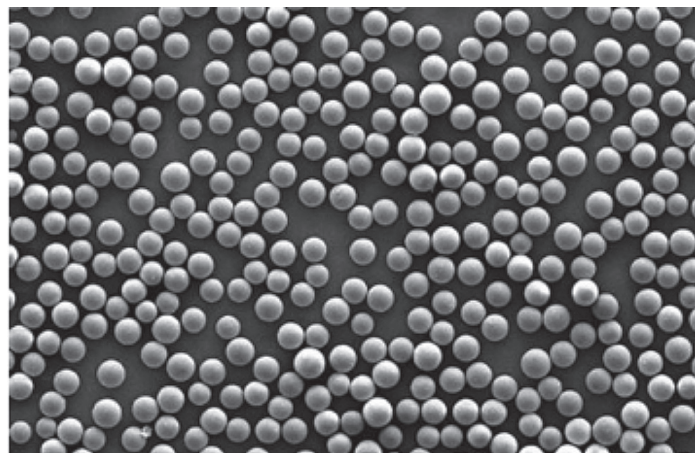


Рис. 1. Полистирольные стандартизованные микросферы – латексные частицы (<https://www.sekisui.co.jp/search/detail-3499.html>).

Fig. 1. Polystyrene standardized microspheres – latex parts (<https://www.sekisui.co.jp/search/detail-3499.html>).

длительном хранении, простота постановки реакции являются основной причиной появления на мировом рынке большой палитры латексных диагностикумов для идентификации микроорганизмов, в т.ч. патогенных, а также для серологической диагностики инфекционных заболеваний.

Алгоритм разработки антительных латексных диагностикумов

Используемая нами в работе схема получения антительных латексных диагностикумов для идентификации бактериальных патогенов включает в себя следующие основные этапы: 1) выбор антигена-мишени, специфичного соответственно для рода, вида или серотипа тестируемого бактериального патогена; 2) выделение, очистка и характеристика антигена-мишени; 3) получение кроличьих поливалентных иммуноглобулинов G, специфичных к выбранному антигену-

мишени; 4) сенсibilизация активированных карбоксильными или стрептавидиновыми функциональными группами латексных частиц специфическими IgG-антителами; 5) испытание чувствительности и специфичности приготовленных латексных диагностикумов.

Выбор антигена-мишени у бактериального патогена зависит от назначения разрабатываемого диагностикума: будет ли он использован для идентификации принадлежности патогена к роду, виду или определенному серотипу (серогруппе). Во всех случаях выбранные антигены-мишени будут различаться между собой. Как правило, в качестве антигенов выступают белки внешней мембраны, липополисахариды (ЛПС) и полисахариды микроба как наиболее специфичные компоненты бактериальной клетки. При конструировании диагностикумов, помимо белков и ЛПС, мы использовали капсульные полисахариды грамположительных бактерий, в частности возбудителей бактериальных гнойных менингитов.

Этап выделения и очистки образца специфического антигена-мишени включает в себя выделение из бактериальной суспензии патогена препарата наружных мембран и последующую экстракцию из них специфичных белков, О-антигенов (полисахаридов ЛПС) или капсульных полисахаридов. Очистку специфических антигенов-мишеней осуществляли хроматографическими методами. У выделенных антигенов определяли чистоту в ПААГ-электрофорезе, а специфичность – в реакции диффузионной преципитации и иммуноблоте с референс-специфическими иммуноглобулинами к целевым антигенам-мишеням. Поливалентные высокотитражные сыворотки получали многократной иммунизацией кроликов (подкожно и/или внутривенно) инактивированной (температурой или фенолом) суспензией целевого микроба. Общая схема выделения целевого антигена-мишени и получения специфических к нему иммуноглобулинов G представлена на рис. 2.

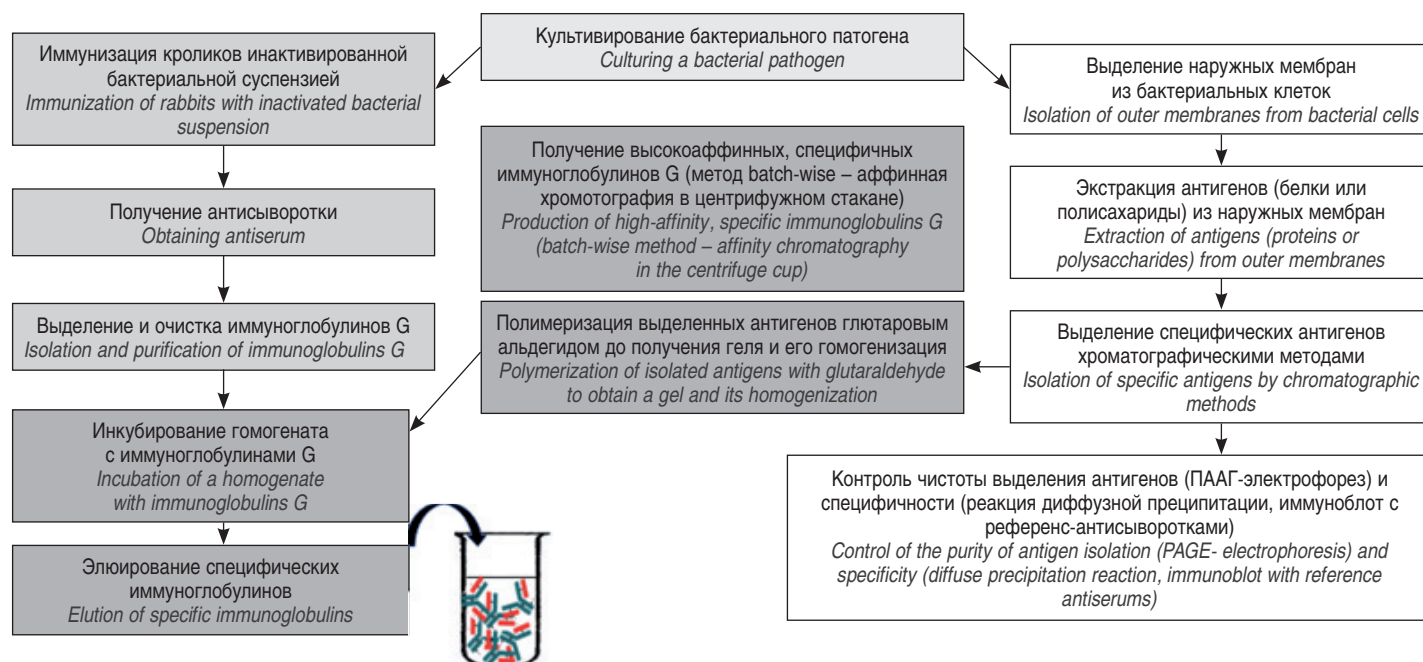


Рис. 2. Схема получения высокоаффинных специфических иммуноглобулинов G.

Fig. 2. Scheme for the production of high-affinity specific immunoglobulins G.

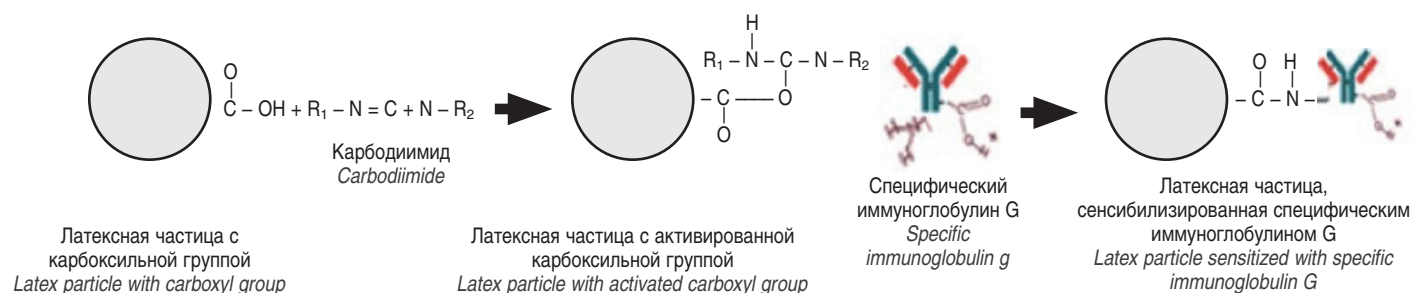


Рис. 3. Сенсibilизация латексных частиц IgG-антителами через пептидную связь.
 Fig. 3. Sensitization of latex IgG parts by antibodies through the peptide bond.

Процесс сенсibilизации, т.е. химического связывания специфических IgG антител с поверхностью латексных частиц, мы осуществляли двумя путями: через пептидную связь или посредством стрептавидин-биотиновой связи [9, 10]. В первом случае использовали коммерческие латексные частицы размером 0,8 мкм с иммобилизованными на их поверхности карбоксильными группами, которые перед сенсibilизацией латексных частиц активировали обработкой карбодиимидом. Процесс сенсibilизации латексных частиц через пептидную связь представлен на рис. 3.

При приготовлении диагностикумов мы чаще всего используем именно латексные частицы, активированные карбоксильными группами, поскольку они гораздо дешевле, чем латексные частицы, активированные стрептавидином. Пептидную связь между латексом и антителами целесообразно использовать в том случае, если к целевому антигену-мишени можно получить высокотитражные иммуноглобулины G. Такие иммуноглобулины, как правило, получают тогда, когда в качестве иммуногенов используют ЛПС (О-антигены) грамотрицательных патогенов (эшерихий, легионелл, иерсиний, кампилобактерий, шигелл и др.) или белковые антигены (листерии).

Сенсibilизацию латексных частиц IgG антителами в ряде случаев осуществляли также через стрептавидин-био-

тиновую связь. Для этой цели использовали коммерческие латексные сферы с иммобилизованными на них функционально активными группами стрептавидина, белка, способного прочно связываться с белком биотином. Биотин, в свою очередь, связывается с Fc-фрагментами молекул иммуноглобулинов, оставляя при этом свободными антигенсвязывающие Fab-фрагменты IgG-антител. Fab-фрагменты антител, иммобилизованных через стрептавидин-биотиновую связь на латексных частицах, обуславливают реагирование их со специфическими антигенными детерминантами патогена, вызывая его агглютинацию. Расположение антител на поверхности латексных частиц Fab-фрагментами наружу увеличивает число их взаимодействий с антигенными эпитопами патогена, тем самым существенно повышая чувствительность диагностикума [10]. Следует отметить, что стрептавидин-биотиновая связь очень прочно удерживает антитела на поверхности латексных частиц. Схема процесса сенсibilизации латексных частиц иммуноглобулинами G через стрептавидин-биотиновую связь представлена на рис. 4.

Поскольку латексные частицы с рекомбинантным стрептавидином стоят гораздо дороже латексных частиц, активированных карбоксильными группами, целесообразно использовать их в том случае, когда получить целевые IgG к

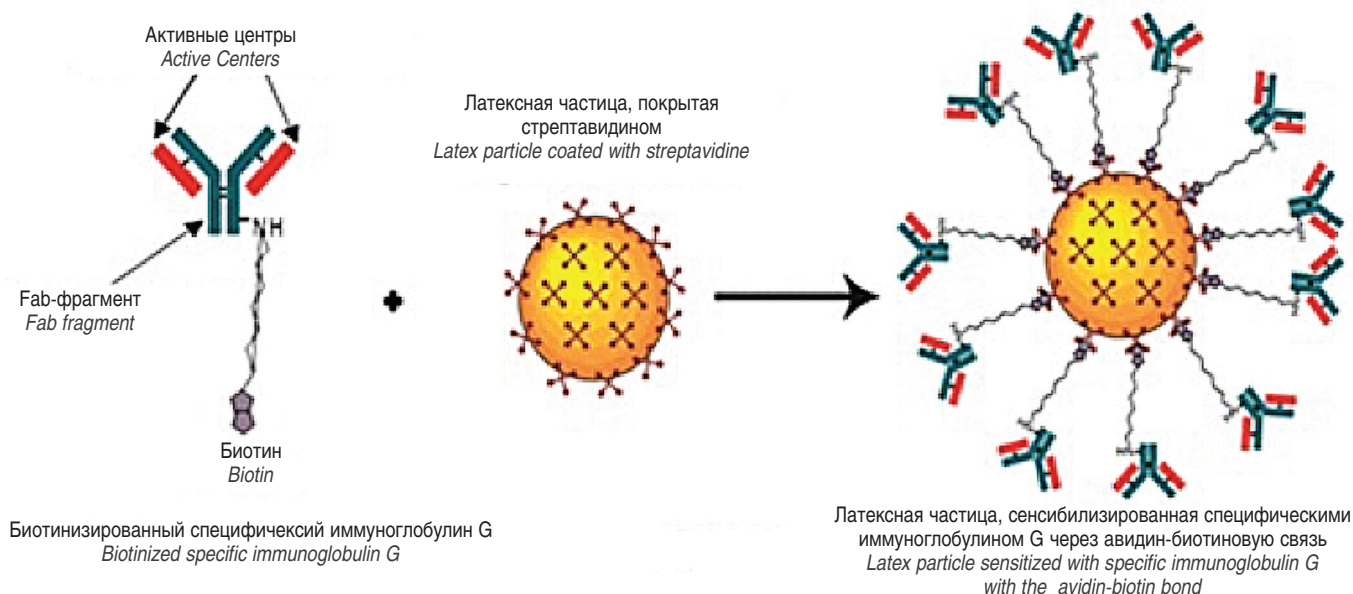


Рис. 4. Сенсibilизация латексных частиц специфическими иммуноглобулинами G через стрептавидин-биотиновую связь.
 Fig. 4. Sensitization of latex particles with specific immunoglobulins G with a streptavidin-biotin bond.

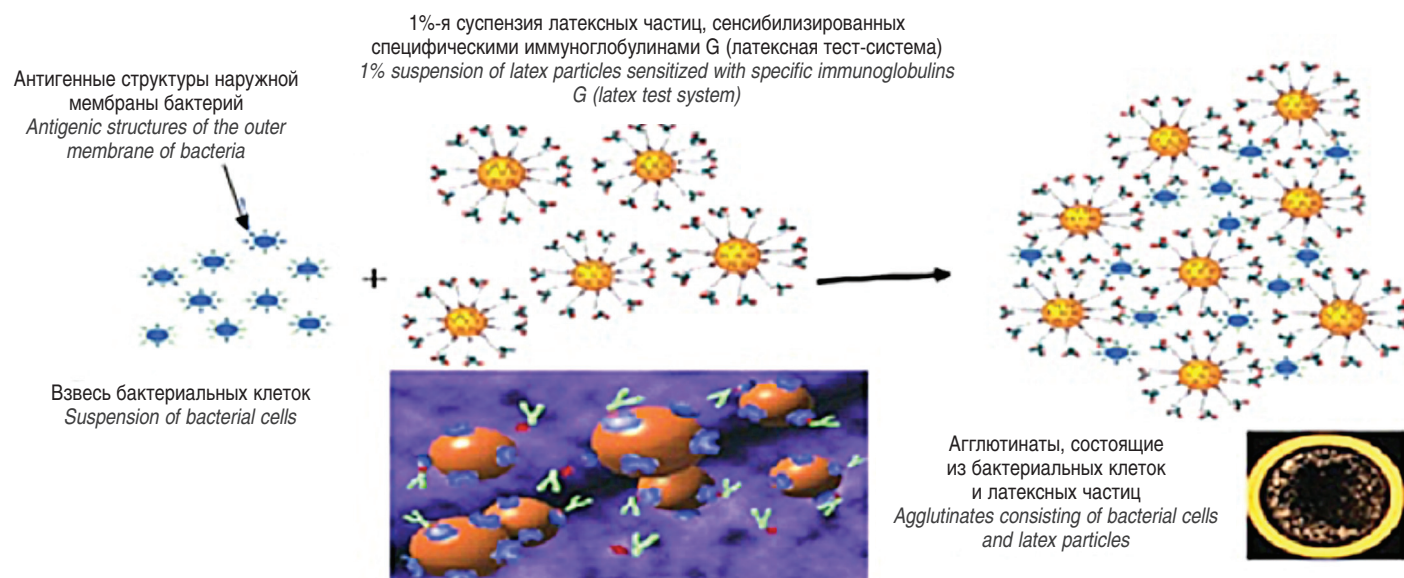


Рис. 5. Постановка реакции латексной агглютинации.
Fig. 5. Setting the latex agglutination reaction.

тестируемому антигену в высоком титре не удастся. Это, например, справедливо в отношении капсульных полисахаридов возбудителей гнойных бактериальных менингитов, обладающих слабой иммуногенностью.

Описанный выше этап сенсibilизации латексных частиц специфическими к тестируемому патогену IgG, собственно, и является конечной стадией приготовления латексного диагностикума. Далее приготовленный диагностикум проверяют на чувствительность и специфичность.

Чувствительность диагностикума – это выраженный в процентах показатель числа положительных реакций тестируемого диагностикума с различными штаммами целевого патогена, для идентификации которого он предназначен. Например, если латексный диагностикум для идентификации *E. coli* серогруппы O157 дает положительную реакцию с 99 из 100 индикаторных штаммов этой серогруппы, то чувствительность этого диагностикума составляет 99%.

Одновременно с чувствительностью определяют специфичность приготовленного диагностикума. Специфичность латексного диагностикума – это выраженный в процентах показатель числа отрицательных реакций испытуемого диагностикума с клетками близкородственных целевому патогену штаммов бактерий. Например, для оценки специфичности «Латексной тест-системы *E. coli* O157:H7» в качестве индикаторных близкородственных штаммов используют *E. coli* других серогрупп и серотипов, а также культуры *Citrobacter* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp. и штаммы некоторых других энтеробактерий. Если испытуемый диагностикум дал положительную реакцию латекс-агглютинации с 5 из 100 индикаторных близкородственных бактерий, то его специфичность составляет 95%. В настоящее время, как правило, реализуемые на рынке латексные диагностикумы имеют высокую чувствительность (98–100%) и достаточно высокую специфичность (95–100%). Приготовленный латексный диагностикум не должен содержать бактериальной микрофлоры.

Антительные латексные диагностикумы в лабораторной практике используют для быстрого поиска и идентификации

патогена среди колоний, выросших на плотной питательной среде после первичного посева исследуемого материала, а также для оперативного контроля (идентификации) патогенных бактерий при работе в лабораторных условиях. Особенно ценна РЛА при массовом мониторинге возбудителей в пищевых продуктах, объектах внешней среды.

Реакцию латекс-агглютинации ставят на обезжиренных стеклах, смешивая каплю (0,02 мл) высококонцентрированной взвеси (хорошо видимой глазом) испытуемого микроба и каплю (0,02 мл) латексного диагностикума. При положительной РЛА в течение 1–2 мин (максимум 5 мин) можно визуально наблюдать образовавшийся агглютинат. Перед постановкой РЛА диагностикум обязательно проверяют на самоагглютинацию (она должна отсутствовать) и на чувствительность (диагностикум должен давать положительную реакцию с позитивным контрольным штаммом) (рис. 5).

Латексный диагностикум для быстрой идентификации *Legionella pneumophila* серотип 1 (по ТУ9398-78095326-2012, Пер. № РЗН 2013 1278)

Легионеллезная инфекция, вызываемая патогенными легионеллами, диагностируется во многих странах мира, включая Российскую Федерацию. Легионеллез может протекать в двух формах: в форме острой пневмонии, когда у человека поражается нижний отдел легких (болезнь легионеров), и в форме гриппоподобной лихорадки (лихорадка Понтиак). Болезнь легионеров, кроме острой пневмонии, сопровождается лихорадкой, интоксикацией, поражением центральной нервной системы, пищеварительного тракта и почек; иногда у больного может развиваться септицемия. Если для лечения легионеллеза не используют эффективные антибиотики, то коэффициент смертности среди больных может достигать 10% и выше [11]. При лихорадки Понтиак легкие не поражаются, исход заболевания благоприятный.

Возбудителем легионеллеза являются широко распространенные в природе бактерии рода *Legionella*, представленного на сегодняшний день 70 видами, из которых только 20 могут вызвать заболевание у человека. Тем не менее, как

показывает клиническая практика, в 90% случаев причиной легионеллеза является только один вид – *L. pneumophila*, насчитывающий в своем составе 16 серогрупп (1–16). Среди этих 16 серогрупп основная роль в этиологии легионеллеза принадлежит серогруппе 1, на долю которой приходится приблизительно 80% всех случаев болезни [12]. Редко легионеллы могут вызывать легионеллы других видов, в частности *L. micdadei*, *L. longbeuchae*, *L. dumoffii*, *L. bozemanni* и некоторые другие [13]. Заражается человек легионеллезом при вдыхании мелкодисперсного аэрозоля или путем аспирации воды, контаминированной патогенными легионеллами. После заражения у 5–10% инфицированных лиц развивается острая пневмония (болезнь легионеров), у 80–95% людей – лихорадка Понтиак [14].

Легионеллы – это грамотрицательные, неспорообразующие прямые или слегка изогнутые палочки длиной от 1 до 20 мкм; они могут образовывать и нитевидные формы, иногда достигающие длины 200 мкм. Свежевыделенные от больных легионеллезом людей культуры легионелл отличаются выраженным полиморфизмом и интенсивным нитеобразованием. Такая вариабельность морфологии клеток через 3–4 пассажа на питательных средах обычно сильно снижается. Жгутики у легионелл, выращенных на питательных средах, отсутствуют, однако они могут образовываться в альвеолах больных людей. Клеточная стенка легионелл, в отличие от других грамотрицательных бактерий, содержит значительное количество фосфолипидов и убихинонов. Количественное соотношение в клеточной стенке жирных кислот и убихинонов используют для идентификации видов *Legionella*. Большинство видов легионелл имеют схожие культуральные и биохимические свойства. Все известные виды легионелл, за исключением *L. micdadei* и *L. feeleii*, продуцируют β-лактамазу и разжижают желатин. Следует заметить, что все серогруппы *L. pneumophila*, возбудителя легионеллеза, за исключением серогрупп 4 и 15, гидролизуют гиппурат натрия [15]. В противоположность многим бактериям, сбраживающим углеводы, легионеллы в качестве источника энергии и питательных веществ используют аминокислоты. L-цистеин является обязательным компонентом питательных сред для выращивания легионелл. Важными факторами роста легионелл являются также аминокислоты аргинин, изолейцин, лейцин, метионин и ионы железа [16].

К факторам патогенности *L. pneumophila* относят расположенный на поверхности клеточной стенки белок Mip, адгезин с молекулярной массой 24 кДа, видоспецифический белок – порин внешней мембраны, с молекулярной массой 29 кДа и родоспецифический антиген цитоплазматической мембраны [17]. К ферментам патогенности *L. pneumophila* относят Zn-металлопротеазу (цитолизин), фосфолипазу C (легиолизин), а также фосфатазы, липазы и нуклеазы. Важную роль в патогенезе легионеллезной инфекции играют токсины, продуцируемые *L. pneumophila*: термостабильный и термолабильный пептиды, нарушающие процесс фагоцитоза патогена макрофагами и ингибирующие «кислородный взрыв» в макрофагах, а также эндотоксин, вызывающий лихорадку, гипогликемию, нарушение кровоснабжения органов и ацидоз. Важным фактором вирулентности *L. pneumophila* являются белки системы секреции 4-го типа, которые предотвращают слияние фагосомы с лизосомой и

формируют репликационную вакуоль для собственного размножения [18].

Для диагностики легионеллеза, вызванного *L. pneumophila*, используют микробиологический метод (выделение и идентификация возбудителя); иммунологические (иммуноферментный анализ, РЛА, иммунохроматографический тест) и молекулярно-генетические (полимеразная цепная реакция в реальном времени). Идентификацию же основного возбудителя легионеллеза *L. pneumophila* серотип 1 проводят с помощью РЛА и иммунохроматографического теста для определения специфического антигена. Из перечисленных методов наиболее простым, быстрым и достаточно информативным является РЛА.

Разработку антительного латексного диагностикума для идентификации *L. pneumophila* серотип 1 проводили в соответствии с предложенным нами алгоритмом. В качестве антигена-мишени был выбран полисахарид (О-антиген) ЛПС *L. pneumophila* серотип 1, определяющий отличие О-антигена серотипа 1 от других 15 серотипов *L. pneumophila* (рис. 6).

Специфические IgG-антитела (титр 1:160–1:320 в реакции диффузионной преципитации) получали шестикратной иммунизацией (попеременное введение антигена внутривенно и/или подкожно) убитой нагреванием взвесью культуры *L. pneumophila* серотип 1. Используя метод batch-wise (см. выше), из сыворотки крови иммунизированных кроликов получали высокоспецифичные (против О-антигена *L. pneumophila* серотип 1) IgG-антитела. Полученными антителами сенсибилизовали латексные частицы, активированные карбоксильными группами, т.е. иммобилизовали антитела на латексных сферах через пептидную связь. Специфичность сенсибилизированных латексных частиц (латексного диагностикума) проверяли на референс-штаммах *L. pneumophila* серотипов 2, 3, 4 и 6, а также на 31 штамме *L. pneumophila* серотипов 2–14 (определенных ранее с помощью латексного диагностикума фирмы Oxoid, Великобритания), выделенных из образцов воды системы горячего водоснабжения 7 городов Российской Федерации, и на штаммах видов *L. micdadei* и *L. longbeuchae*. Ни один из 37 испытанных штаммов легионелл не дал положительной реакции РЛА. Таким образом, полученные результаты говорят о высокой специфичности приготовленного препарата.

Чувствительность диагностикума испытывали на 13 штаммах *L. pneumophila* серотип 1, изолированных из образцов воды систем горячего водоснабжения городов различных регионов России. Все штаммы давали быструю (в течение 1–2 мин) положительную РЛА на стекле.

Диагностикум производится и реализуется ФБУН «ГНЦ ПМБ» медицинским учреждениям уже более 9 лет, ни одной рекламации на качество диагностикума от потребителей не поступало.

Латексный диагностикум для быстрой идентификации возбудителей гнойных бактериальных менингитов (Латексная тест-система ГБМ) по ТУ 9398-202-78095326-2013, Рег. № РЗН 2014/2268

Бактериальные гнойные менингиты (ГБМ) – группа инфекционных заболеваний нервной системы, характеризующихся развитием общепериферического, общемозгового и

менингеального синдромов, а также воспалительными изменениями в цереброспинальной жидкости гнойного характера [19]. По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно в мире регистрируется 1 млн случаев ГБМ, из которых 200 тыс. заканчиваются летально [20].

Основными возбудителями ГБМ являются бактерии трех видов: *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*. Реже причиной ГБМ могут быть другие виды микроорганизмов, например *L. monocytogenes*, *E. coli* и *Acinetobacter baumannii*.

N. meningitidis (менингококки) – грамотрицательные, неподвижные, не образующие спор, бобовидной формы диплококки диаметром 0,6–0,8 мкм, относятся к роду *Neisseria*, семейству *Neisseriaceae*. Большинство видов рода являются непатогенными [21]. *N. meningitidis* весьма требовательны к питательным средам: хорошо растут при добавлении в среду крови или сыворотки крови животных. Оптимальная температура для роста патогена – 37°C при содержании в атмосфере 10% CO₂. Через 24 ч роста на кровяном агаре появляются мелкие прозрачные колонии с ровными краями; спустя 2–3 суток колонии увеличиваются в размере и становятся мутными, непрозрачными с неровными краями. Ферментативные свойства *N. meningitidis* относительно слабые: из числа многих углеводов они сбраживают только глюкозу и мальтозу с образованием кислоты без газа. *N. meningitidis* не разжижают желатин, оксидазо- и каталазоположительны. Клеточная стенка нейссерий представлена цитоплазматической мембраной, пептидогликановым слоем, наружной мембраной, содержащей ЛПС и белки. Кроме того, все инвазивные штаммы *N. meningitidis* образуют капсулы полисахаридной природы, являющиеся основными факторами вирулентности менингококков. По химической

структуре и антигенным свойствам капсульных полисахаридов *N. meningitidis* подразделяются на 13 серогрупп: А, В, С, D, H, I, K, L, X, Y, Z, W-135 и 29E. Из перечисленных наибольшее эпидемиологическое и клиническое значение имеют серогруппы А, В, С, W-135, Х и Y, на долю которых в настоящее время приходится >90% случаев гнойных менингитов.

Единственным хозяином и резервуаром нейссерий является человек. Место обитания нейссерий – слизистая носоглотки, которую менингококки могут колонизировать в разные периоды жизни человека. Источником *N. meningitidis* для здоровых людей являются больные менингококковой инфекцией и носители патогена. Несмотря на то, что ГБМ чаще всего поражают детей младшего возраста (до 5 лет), число носителей среди них, по крайней мере в странах Западной Европы, относительно невелико, зато число носителей среди лиц юношеского возраста, например в Великобритании, достигает 25–30% [22]. В поясе так называемого «африканского менингита» частота носительства наиболее высока – 5% у детей в возрасте 5–14 лет [23]. Носительство инвазивных клонов нейссерий у лиц с еще неразвитой иммунной системой (у детей до одного года), а также у лиц с иммунодефицитом является опасным предрасполагающим фактором для развития ГБМ. Использование вакцины против ГБМ существенно профилактирует носительство возбудителя у людей и заболеваемость ГБМ. Системную менингококковую инфекцию и ГБМ регистрируют как в виде спорадических случаев, так и вспышечных случаев.

Человек заражается инвазивными *N. meningitidis* аэрогенным путем или при тесном контакте с больным менингококковой инфекцией. Попадая на слизистую оболочку носоглотки,

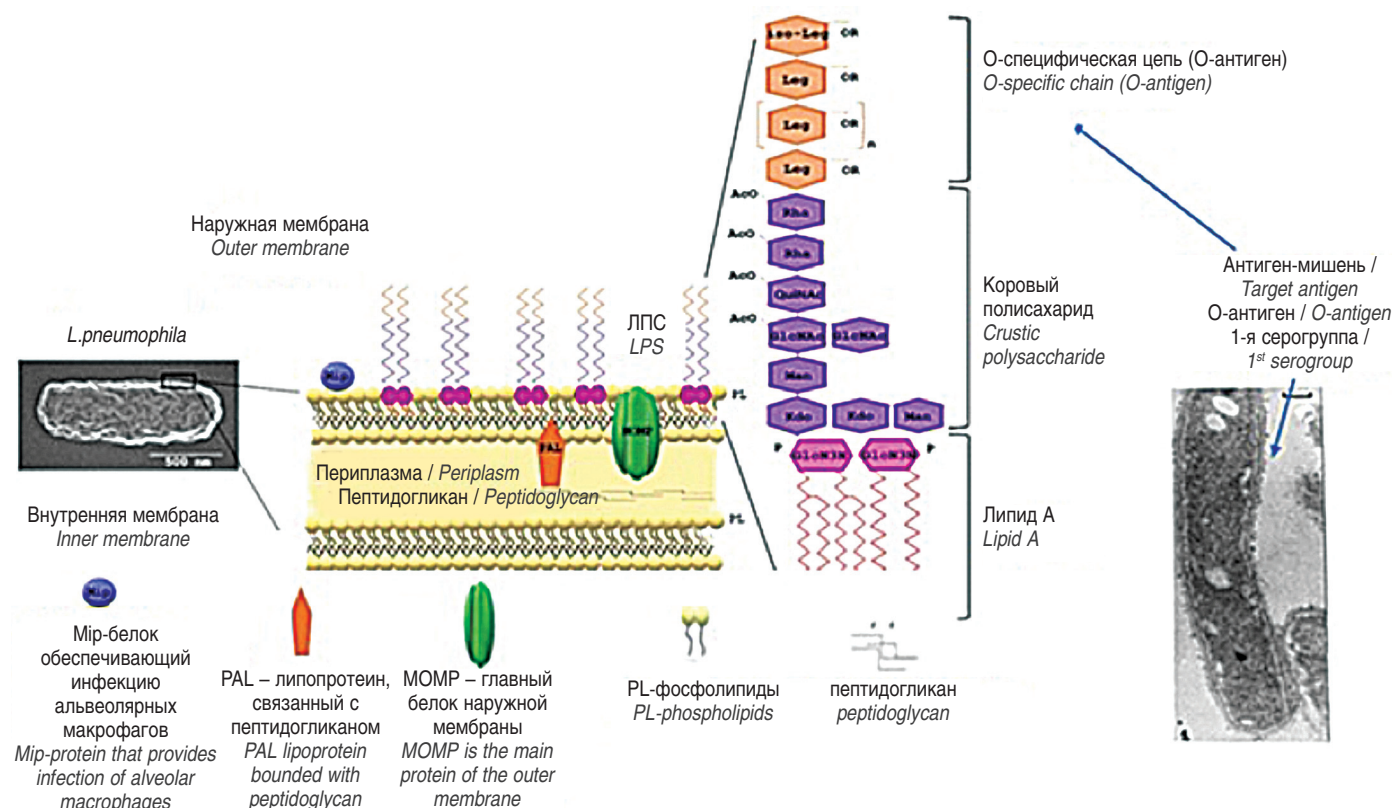


Рис. 6. Антигенная структура внешней мембраны *L. pneumophila*.
 Fig. 6. Antigenic structure of the outer membrane of *L. pneumophila*.

патоген колонизирует ее и, при условии высокой вирулентности и сниженного иммунного статуса человека, может проникнуть в кровяное русло и вызвать либо тяжелую системную менингококковую инфекцию, либо бактериемию, поражая отдельные органы. Если *N. meningitidis* преодолевают гематоэнцефалический барьер, то они способны вызвать менингит – поражение мягких оболочек головного и спинного мозга. Возбудитель способен размножаться в спинномозговой жидкости, накапливаясь в ней, изменяя ее цвет и вязкость (гнойное воспаление).

Основными возбудителями ГБМ, как указано выше, являются менингококки серогрупп А, В, С, W-135, X и Y, однако этиологическая структура инвазивных ГБМ может существенно отличаться в разных странах. Это во многом зависит не столько от географического расположения страны, сколько от типа (антигенной структуры) используемых в стране конъюгативных вакцин против ГБМ. По мнению ряда авторов, в результате широкого использования вакцин в мире происходит глобальная эволюция в этиологической структуре ГБМ: в ряде стран вместо серогрупп А и С при ГБМ чаще стали выделять менингококки серогрупп В, X, Y и W-135. Поэтому так важно проводить идентификацию серогрупп *N. meningitidis*, поскольку от этого зависит научно обоснованное создание эффективных антименингококковых вакцин [24].

S. pneumoniae – грамположительные бактерии, нередко встречающиеся в микробиоте слизистой верхних дыхательных путей человека, единственного «хозяина» пневмококков. Основным резервуаром и источником *S. pneumoniae* являются дети в возрасте до 5 лет. Носительство пневмококков у детей может продолжаться от нескольких недель до 3–5 мес. Во время носительства у детей формируется специфический иммунитет (в ответ на капсульные полисахариды и белки патогена), в результате чего происходит элиминация *S. pneumoniae* из организма ребенка. Однако в ряде случаев у детей, под влиянием различных внутренних и внешних неблагоприятных факторов, *S. pneumoniae* может вызвать клинически выраженные заболевания. Инфекции, обусловленные пневмококками, принято делить на поверхностные (мукозальные), к которым относятся, например, острый средний отит, и тяжелые инвазивные формы пневмококковой инфекции, такие как пневмония, сепсис и менингит. Чаще всего пневмококковая инфекция поражает детей и пожилых людей, страдающих хроническими заболеваниями, а также иммунокомпрометированных пациентов. Передаются *S. pneumoniae* от человека человеку воздушно-капельным или контактным путем (через инфицированные руки), редко через употребление пищи. По некоторым оценкам, ежегодно в мире только среди детей до 5 лет регистрируется свыше 14 млн тяжелых случаев пневмококковой инфекции, из них приблизительно 800 тыс. заканчиваются летально [25].

S. pneumoniae – кокки овоидной или ланцетовидной формы диаметром около 1 мкм. В мазках из клинического материала они располагаются попарно (диплококки), окружены мощной капсулой, являющейся основным фактором вирулентности пневмококков (бескапсульные варианты авирулентны для мышей). Капсула защищает патоген от фагоцитоза и от действия комплемента. *S. pneumoniae* хорошо растут на средах с кровью или сывороткой крови, образуя на

сывороточном агаре мелкие полупрозрачные колонии округлой формы диаметром около 1 мм; колонии никогда не сливаются между собой. На кровяном агаре вокруг колоний видна зеленоватая зона гемолиза, вызванная α -гемолизинном. Пневмококки, в отличие от зеленящих стрептококков, чувствительны к оптохину – веществу, задерживающему рост практически 100% клинических изолятов. Патоген также чувствителен к солям желчных кислот, но, в отличие от зеленящих стрептококков, сбраживает инулин. Основные компоненты клеточной стенки пневмококков – цитоплазматическая мембрана, пептидогликановый слой, тейхоевые кислоты и связанные с ними белки. Следует особо отметить, что находящаяся в составе клеточной стенки тейхоевая кислота содержит фосфорил-холиновую часть и С-полисахарид, которые вместе образуют видоспецифический антиген, т.е. общий антиген для представителей вида *S. pneumoniae*. Этот комплексный антиген быть может использован в качестве антигена-мишени для получения видоспецифических анти-*S. pneumoniae* диагностических антител. Кроме того, в клеточной стенке имеется несколько холин-связанных белков, нековалентно соединенных с холиновой частью тейхоевой кислоты и также обладающих свойствами видоспецифических антигенов. Среди этих белков преобладают белки PspC и PspA. Входящая в состав клеточной стенки липотейхоевая кислота обладает свойствами антигена Форсмана, общего для бактерий и млекопитающих [26].

Штаммы *S. pneumoniae*, выделяемые от людей, весьма гетерогенны по составу и антигенной структуре их капсульных полисахаридов. В настоящее время известно 93 капсульных серотипа, однако роль их в патологии далеко не одинакова. Наиболее частыми возбудителями пневмококковых инфекций во многих странах в период с 1980 по 2007 г. являлись серотипы 1, 5, 6A, 6B, 14, 19F и 23F, а самым распространенным среди них был серотип 14. Следует, однако, заметить, что серотиповый пейзаж *S. pneumoniae* в разных географических зонах может сильно различаться. Например, в Санкт-Петербурге в период с 2010 по 2015 г. преобладали 4 серотипа: 19F, 23F, 3 и 6. В Смоленской области в период с 2006 по 2018 г. возбудителями стрептококкового менингита были серотипы 6A/B, 3, 19F, 14, 9VA и 23F. Показано, что разнообразие серотипового пейзажа *S. pneumoniae* зависит не только от географического региона, но также и от масштаба применения противопневмококковых вакцин. В настоящее время во многих странах мира для профилактики инвазивных пневмококковых инфекций, а также носительства *S. pneumoniae* с успехом применяют 7-, 10- и 13-валентные полисахаридные конъюгированные вакцины, которые содержат разное количество специфических капсульных полисахаридов. Показано, что вакцинация населения указанными препаратами постепенно приводит к элиминации тех серотипов *S. pneumoniae*, полисахариды которых входят в вакцину. Поэтому так важно для контроля за эпидемиологической ситуацией по пневмококковым инфекциям, включая ГБМ, проводить выделение от больных пациентов и детей-носителей культуры *S. pneumoniae* с последующим их серотипированием [27].

H. influenzae тип b до настоящего времени остается основным этиологическим агентом тяжелых форм гемофильной инфекции у младенцев и детей до 5-летнего возраста –

острой пневмонии и гнойного менингита, которые сопровождаются высокой смертностью [28]. Особенно *H. influenzae* тип b-инфекция (Hib-инфекция) актуальна для развивающихся стран, где вакцинацией против *H. influenzae* тип b охвачена лишь незначительная часть детей в возрасте до 5 лет. В тех же странах, где для профилактики Hib-инфекции используют конъюгированную вакцину (США и страны Европейского союза), роль *H. influenzae* в структуре пневмоний и гнойных менингитов резко сократилась, например, в США с 45–48% (до применения вакцины) до 7% (после начала ее применения в 1990-е гг.) [28]. Важно отметить, что в США и странах Европейского союза гемофильную инфекцию, вызванную *H. influenzae* тип b, стали чаще диагностировать у взрослого населения. В Российской Федерации конъюгированную вакцину против Hib-инфекции пока не производят, охват детей вакцинацией против Hib-инфекции, производимый импортными препаратами, незначительный, вследствие чего случаи этой инфекции, в т.ч. и гнойного менингита, среди детей продолжают регистрироваться [29].

H. influenzae тип b относится к роду *Haemophilus*, семейству *Pasteurellaceae*, представляет собой мелкие грамотрицательные неподвижные палочки овоидной (кокковидной) формы, окруженные полисахаридной капсулой, спор не образуют. Бактерии относятся к факультативным анаэробам. *H. influenzae* являются мезофилами – оптимальная для их роста температура составляет 35–37°C. Патоген весьма требователен к питательным средам: для своего роста *in vitro* он требует обязательной добавки двух субстанций: X (гемин) и V (никотинамидадениндинуклеотид (НАД)), которые сам микроб не синтезирует. Традиционно для выделения и выращивания *H. influenzae* тип b используют шоколадный агар, который получают добавлением 5–10% дефибрированной крови к основе кровяного агара. Смесь прогревают при 80°C в течение 15–20 мин для высвобождения НАД из эритроцитов крови, а также для инактивации НАД-разрушающих ферментов. При росте на шоколадном агаре *H. influenzae* тип b образует большие, выпуклые, сероватые непрозрач-

ные колонии. При использовании шоколадного агара для выделения *H. influenzae* тип b важно учитывать, что на этой среде могут вырастать и другие виды рода *Haemophilus* [30].

Для идентификации возбудителей гнойных бактериальных менингитов *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* используют все современные методы диагностики: микробиологические, иммунологические, молекулярно-генетические и физико-химические, времяпрелетную масс-спектрометрию с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI-TOF MS) [30]. Однако во всех случаях диагностики ГБМ важно выделить от больного чистую культуру возбудителя. Это необходимо для его идентификации, определения чувствительности к антимикробным препаратам и назначения эффективного лечения больного. Выделение культуры необходимо и для определения серотиповой принадлежности патогена (с целью оптимального антигенного состава разрабатываемых вакцин против *N. meningitidis* и *S. pneumoniae*). Это также важно для генотипирования выделяемых культур с целью выявления эпидемически значимых генетических линий возбудителей ГБМ.

Важное место в экстренной диагностике ГБМ отводится РЛА, которая позволяет, в случае наличия возбудителя в спинномозговой жидкости, в течение 15–20 мин идентифицировать принадлежность его к виду (*N. meningitidis*, *S. pneumoniae* или *H. influenzae* тип b) и сразу назначить эмпирическую антимикробную терапию. РЛА является эффективным инструментом для поиска и идентификации колоний возбудителей, выросших на специальных средах после первичного высева исследуемого материала [31]. Следует, однако, учитывать, что в том случае, когда до исследования спинномозговой жидкости больного лечили эффективными антибиотиками, возбудитель в спинномозговой жидкости может и не обнаруживаться в РЛА.

При разработке латексных диагностикомов для идентификации возбудителей ГБМ – *N. meningitidis* типов A, B, C и W-135, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* тип b – использовали тот же алгоритм, что и при разработке описанных выше диа-

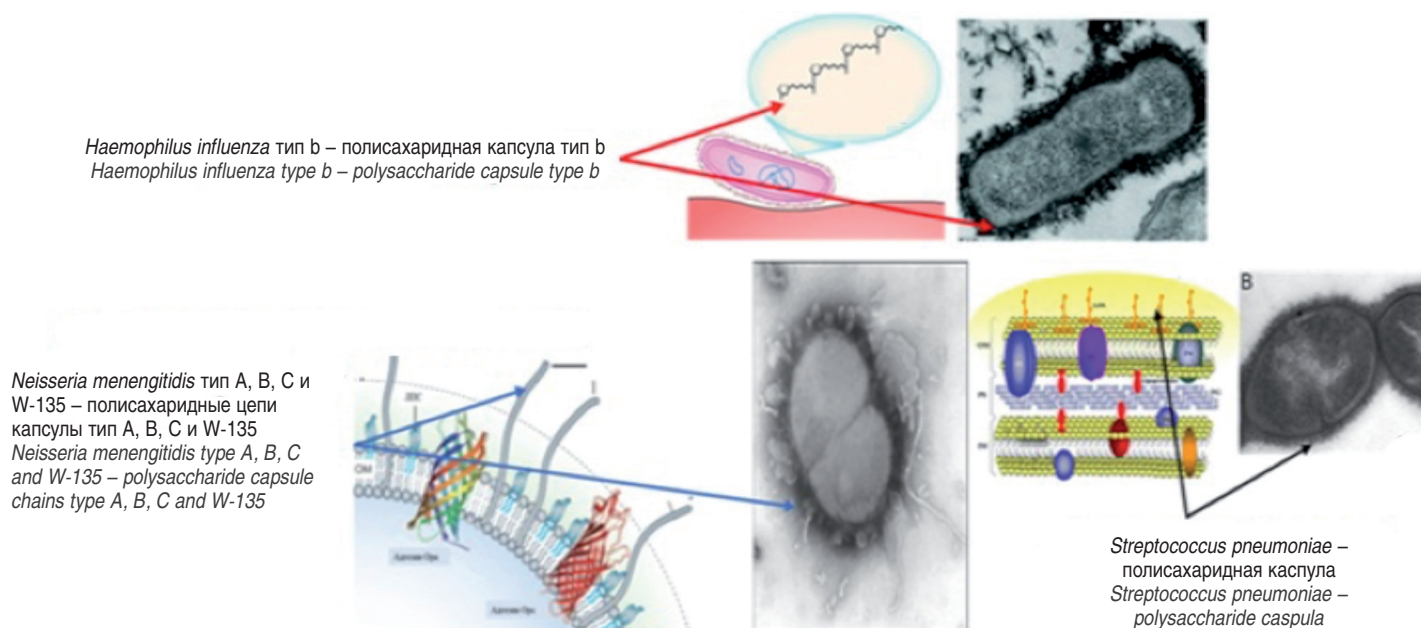


Рис. 7. Антигены-мишени возбудителей гнойных бактериальных менингитов.
 Fig. 7. Target antigens of pathogens of purulent bacterial meningitis.

гностикомов: выбор мишени, выделение и очистка препарата антигена-мишени, получение специфических IgG-антител, сенсibilизация латексных частиц, проверка чувствительности и специфичности полученных диагностикомов. В качестве антигенов-мишеней для *N. meningitidis* были выбраны капсульные полисахариды типов A, B, C и W-135, для *S. pneumoniae* – видоспецифический комплексный антиген клеточной стенки, состоящий из фосфорил-холиновой части и C-полисахарида тейхоевой кислоты, для *H. influenzae* тип b – типоспецифический капсульный полисахарид (рис. 7).

Специфические IgG-антитела к антигенам-мишеням получали с помощью 6–8-кратной иммунизации кроликов инактивированными температурой препаратами соответствующих штаммов-продуцентов антигенов-мишеней. Весьма важно, чтобы культура иммунизирующего штамма имела хорошо выраженные капсулы, что достигается выращиванием штамма-продуцента на кровяных питательных средах. Поскольку специфические полисахариды обладают слабой иммуногенностью, получить препараты IgG-антител в высоком титре не удастся. Как правило, титры IgG-антител к антигенам возбудителей ГБМ составляют не более 1:16–1:32. В связи с невысокой концентрацией получаемых IgG-антител для сенсibilизации латексных частиц IgG-антителами мы использовали стрептоавидин-биотиновую связь, которая обеспечивает прочную связь Fc-фрагмента антител с латексной сферой, оставляя свободными антигенсвязывающие Fab-фрагменты, что существенно повышает чувствительность латексного диагностикомов.

Таким образом, для идентификации основных возбудителей ГБМ было разработано 6 отдельных латексных диагностикомов: 4 для определения A, B, C и W-135 типов *N. meningitidis* и 2 для идентификации *S. pneumoniae* и *H. influenzae* тип b. Чувствительность приготовленных диагностикомов была проверена на штаммах *N. meningitidis* ($n = 14$), *S. pneumoniae* ($n = 50$) и *H. influenzae* тип b ($n = 9$). Все использованные индикаторные культуры дали положительную реакцию в латекс-агглютинации с соответствующими диагностикомов, то есть чувствительность разработанных диагностикомов была равной 100%. Специфичность латексных диагностикомов для идентификации A, B, C и W-135 типов *N. meningitidis* составляла 100%, для идентификации *S. pneumoniae* – 95%, для идентификации *H. influenzae* тип b – 96%.

Заключение

Предложенный нами алгоритм разработки антителных латексных диагностикомов, включающий в себя этапы выбора антигена-мишени, получения поливалентных специфических IgG-антител к выбранным антигенам, сенсibilизации специфическими IgG-антителами латексных частиц, позволяет получать высокочувствительные и высокоспецифичные латексные диагностикомов для быстрой идентификации бактериальных патогенов. С использованием предложенного алгоритма были разработаны две латексные тест-системы: для идентификации *L. pneumophila* серотип 1 и возбудителей гнойных бактериальных менингитов *N. meningitidis* типов A, B, C и W-135, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* тип b. Обе тест-системы зарегистрированы в Российской Федерации и используются в лабораторной диагностической практике (рис. 8).

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the branch program of 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. Старовойтова А, Стериополо НА, Зайко ВВ, Венгеров ЮЮ. Латексная агглютинация с видеоцифровой регистрацией: повышение диагностической значимости традиционного метода. Клиническая лабораторная диагностика. 2012;2:7-13. / Starovoitova A, Steriololo NA, Zaiko VV, Vengerov YuYu. Latex agglutination with video-digital registration: increasing diagnostic significance of the traditional method. Clinical Laboratory Diagnostics. 2012;2:7-13. DOI: 616-078.33:681 (In Russian).
2. Максимова ЖВ, Максимов ДМ. Скрининг: современный взгляд на раннюю диагностику и профилактику хронических неинфекционных заболеваний. Архив внутренней медицины. 2014;6(20):36-46. / Maksimova JV, Maksimov



Рис. 8. Фото и регистрационные удостоверения латексных тест-систем для идентификации *L. pneumophila* серотип 1 и возбудителей гнойных бактериальных менингитов *N. meningitidis* типов A, B, C и W-135; *S. pneumoniae* и *H. influenzae* тип b.

Fig. 8. Photo and registration certificates of latex test systems for the identification of *L. pneumophila* serotype 1 and pathogens of purulent bacterial meningitis *N. meningitidis* types A, B, C and W-135; *S. pneumoniae* and *H. influenzae* type b.

- DM. Screening: a modern view on early diagnosis and prevention of chronic non-infectious diseases. *Archives of Internal Medicine*. 2014;6(20):36-46. DOI: 10.20514/2226-6704-2014-0-6-52-57 52 -56 (In Russian).
3. Diallo K, Fetei VF, Ibe L, Antonio M, Cagant DA, du Plessis M, et al. Molecular diagnostic assays for the detection of common bacterial meningitis pathogens: A narrative review. *EBioMedicine*. 2021 Mar;65:103274. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103274
4. Balamurugan V, Thirumalesh SRA, Alamuri A, SowjanyaKumari S, Vinod Kumar K, Linshamol L, et al. Evaluation of the diagnostic potential of recombinant leptospiral OMP A-like protein (Loa22) and transmembrane (OmpL37) protein in latex agglutination test for serodiagnosis of leptospirosis in animals. *Lett Appl Microbiol*. 2021 Jun;72(6):730-740. DOI: 10.1111/lam.13461
5. Trovero AC, Mazza M, Rogé A, Rivas MC, Bordagorria X, Bruno S, et al. Production of a latex agglutination reagent for the rapid diagnosis of cryptococcal meningitis. *Rev Argent Microbiol*. 2020 Jul-Sep;52(3):169-175. DOI: 10.1016/j.ram.2019.06.002
6. Drew P. Infectious and tropical diseases. *Oxford handbook of clinical and laboratory investigation* (4 ed). 2018:381-434 DOI: 10.1093/med/9780198766537.003.0005
7. Bergwerff AA, Debast SB. Modernization of Control of Pathogenic Micro-Organisms in the Food-Chain Requires a Durable Role for Immunoaffinity-Based Detection Methodology – A Review. *Foods*. 2021 Apr 11;10(4):832. DOI: 10.3390/foods10040832
8. Мамедов МК. Иммунохимия: вековой путь от реакции агглютинации до лигандного иммуноанализа. *Биомедицина*. 2007;3:35-47. / Mamedov MK. Immunochemistry: a century's journey from agglutination reaction to ligand immunoassay. *Biomedicine*. 2007;3:35-47. (In Russian).
9. Inzana TJ. Simplified procedure for preparation of sensitized latex particles to detect capsular polysaccharides: application to typing and diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 1995 Sep;33(9):2297-303. DOI: 10.1128/jcm.33.9.2297-2303.1995
10. Chen T, Hedman L, Mattila PS, Jartti L, Jartti T, Ruuskanen O, et al. Biotin IgM antibodies in human blood: a previously unknown factor eliciting false results in biotinylation-based immunoassays. *PLoS One*. 2012;7(8):e42376. DOI: 10.1371/journal.pone.0042376
11. Ерусланов БВ, Светоч ЭА, Мицевич ИП. Легионеллез и его лабораторная диагностика. *Бактериология*. 2018;3(3):58-67. / Yeruslanov BV, Svetoch EA, Mitsevich IP. Legionellosis and its laboratory diagnosis. *Bacteriology*. 2018;3(3):58–67. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-58-67 (In Russian).
12. Kanarek P, Bogiel T, Breza-Boruta B. Legionellosis risk – an overview of *Legionella* spp. habitats in Europe. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2022 Nov;29(51):76532-76542. DOI: 10.1007/s11356-022-22950-9
13. Izquierdo E, Gil-de-Miguel Á, Rodríguez-Caravaca G. *Legionella pneumophila* Risk from Air-Water Cooling Units Regarding Pipe Material and Type of Water. *Microorganisms*. 2023 Mar 2;11(3):638. DOI: 10.3390/microorganisms11030638
14. Тартаковский ИС, Адгамов РР, Ермолаева СА, Дронина ЮЕ, Карпова ТИ, Галстян ГМ, и др. Методические особенности диагностики легионеллезной пневмонии в лечебно-профилактических учреждениях. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2013;15(3):166-172. / Tartakovsky IS, Adgamon RR, Ermolaeva SA, Dronina YuE, Karpova TI, Galstyan GM, et al. Methodological features of diagnosis of legionellosis pneumonia in medical and preventive institutions. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2013;15(3):166-172. (In Russian).
15. Тартаковский ИС, Галстян ГМ, Карпова ТИ, Катрыш СА, Дронина ЮЕ, Садретдинова ОВ. Методические особенности диагностики легионеллезной пневмонии в лечебно-профилактических учреждениях. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2012;14(2):100-1066. / Tartakovsky IS, Galstyan GM, Karpova TI, Katrysh SA, Dronina YuE, Sadretidinova OV. Methodological features of diagnosis of legionellosis pneumonia in medical and preventive institutions. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;14(2):100-1066. (In Russian).
16. Mondino S, Schmidt S, Rolando M, Escoll P, Gomez-Valero L, Buchrieser C. Legionnaires' Disease: State of the Art Knowledge of Pathogenesis Mechanisms of *Legionella*. *Annu Rev Pathol*. 2020 Jan 24;15:439-466. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032742
17. Mercante JW, Winchell JM. Current and emerging *Legionella* diagnostics for laboratory and outbreak investigations. *Clin Microbiol Rev*. 2015 Jan;28(1):95-133. DOI: 10.1128/CMR.00029-14
18. Chauhan D, Shames SR. Pathogenicity and Virulence of *Legionella*: Intracellular replication and host response. *Virulence*. 2021 Dec;12(1):1122-1144. DOI: 10.1080/21505594.2021.1903199
19. Матосова СВ, Миронов КО, Платонов АЕ, Шипулина ОЮ, Шипулин ГА, Нагибина МВ, и др. Молекулярно-биологический мониторинг возбудителей гнойного бактериального менингита на современном этапе. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2018;7:93-99. / Matosova SV, Mironov KO, Platonov AE, Shipulina OYu, Shipulin GA, Nagibina MV, et al. Molecular and biological monitoring of purulent bacterial meningitis pathogens at the present stage. *Infectious Diseases: News, Opinions, Learning*. 2018;7:93-99. (In Russian).
20. Оганесян АН, Воропаева ЕА, Мельникова АА, Миронов АЮ, Егорова ЕА, Урбан ЮН, и др. Эффективность методов лабораторной диагностики гнойного бактериального менингита. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019;64(2):117-121. / Oganessian AN, Voropaeva EA, Mel'nikova AA, Mironov AYU, Egorova EA, Urban YuN, et al. Efficacy of laboratory methods of diagnostic of purulent bacterial meningitis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019;64(2):117-121. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-2-117-121 (In Russian).
21. Clemence MEA, Maiden MCJ, Harrison OB. Characterization of capsule genes in non-pathogenic *Neisseria* species. *Microb Genom*. 2018 Sep;4(9):e000208. DOI: 10.1099/mgen.0.000208
22. Masri A, Alassaf A. Recurrent meningitis in children: etiologies, outcome, and lessons to learn. *Childs Nerv Syst*. 2018;34(8):1541-1547. DOI: 10.1007/s00381-018-3815-9
23. Cooper LV, Kristiansen PA, Christensen H, Karachaliou A, Trotter CL. Meningococcal carriage by age in the African meningitis belt: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiol Infect*. 2019 Jan;147:e228. DOI: 10.1017/S0950268819001134
24. Davis LE. Acute bacterial meningitis. *Continuum (Minneapolis)*. 2018;24(5, Neuroinfectious Disease):1264-1283. DOI: 10.1212/CON.0000000000000660
25. Mook-Kanamori BB, Geldhoff M, van der Poll T, van de Beek D. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clin Microbiol Rev*. 2011 Jul;24(3):557-91. DOI: 10.1128/CMR.00008-11
26. Chun YY, Tan KS, Yu L, Pang M, Wong MHM, Nakamoto R, et al. Influence of glycan structure on the colonization of *Streptococcus pneumoniae* on human respiratory epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023 Mar 28;120(13):e2213584120. DOI: 10.1073/pnas.2213584120
27. Glanville DG, Gazioglu O, Marra M, Tokars VL, Kushnir T, Habtom M, et al. Pneumococcal capsule expression is controlled through a conserved, distal cis-regulatory element during infection. *PLoS Pathog*. 2023 Jan 31;19(1):e1011035. DOI: 10.1371/journal.ppat.1011035
28. Салимова Е, Конон А, Трухин В, Красильников И. Мировые тенденции в изоляции, идентификации и характеристике *Haemophilus influenzae* тип В – возбудителя гемофильной инфекции. *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2019;1:87-93. / Salimova E, Konon A, Trukhin V, Krasilnikov I. Global trends in isolation, identification, and characterization of *Haemophilus influenzae* type B, the causative agent of *Haemophilus influenzae* infection. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences, Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2019;1:87-93. (In Russian).
29. Pinto M, González-Díaz A, Machado MP, Duarte S, Vieira L, Carriço JA, et al. Insights into the population structure and pan-genome of *Haemophilus influenzae*. *Infect Genet Evol*. 2019 Jan;67:126-135. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.10.025

30. Takeuchi N, Segawa S, Ishiwada N, Ohkusu M, Tsuchida S, Satoh M, et al. Capsular serotyping of *Haemophilus influenzae* by using matrix-associated laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Infect Chemother*. 2018 Jul;24(7):510-514. DOI: 10.1016/j.jiac.2018.02.007
31. Kennedy WA, Chang SJ, Purdy K, LE T, Kilgore PE, Kim JS, et al. Incidence of bacterial meningitis in Asia using enhanced CSF testing: polymerase chain reaction, latex agglutination and culture. *Epidemiol Infect*. 2007 Oct;135(7):1217-26. DOI: 10.1017/S0950268806007734

Информация о соавторах:

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

Ерусланов Борис Васильевич, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Мицевич Ирина Петровна, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Храмов Михаил Владимирович, кандидат медицинских наук, заместитель директора 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

Information about co-authors:

Edward A. Svetoch, PhD, DSc (Veterinary Science), Professor, Chief researcher of Antimicrobial agents laboratory, Molecular Microbiology Departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Boris V. Eruslanov, MD, PhD, DSc, Leading Researcher of antimicrobial agents laboratory, Molecular Microbiology Departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

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

Mikhail V. Khranov, PhD, MD, Deputy Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

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

НОВОСТИ НАУКИ

Использование цианобактерий для преобразования углекислого газа в глюкозу

Глюкоза является наиболее распространенным моносахаридом, служащим важным источником энергии для клеток и важным сырьем для биоперерабатывающей промышленности. Маршрут «растение—биомасса—сахар» доминирует в текущем поступлении глюкозы, в то время как на него влияет множество параметров, таких как циклы выращивания растений, радиус сбора биомассы и затраты на предварительную обработку.

На фоне глобального климатического кризиса и обострения нехватки продовольствия необходима разработка более эффективных, непрерывных и промышленных способов производства глюкозы. Однако прямое превращение углекислого газа в глюкозу посредством естественного процесса фотосинтеза долгое время не совершало прорыва.

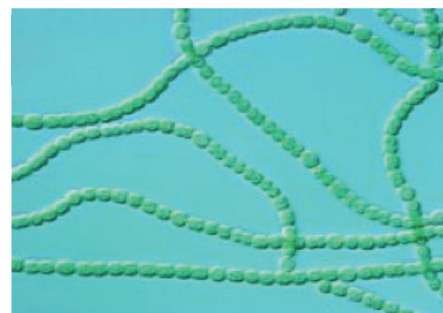
Исследовательская группа под руководством профессора Лу Сюэфэна и профессора Луань Годуна из Института биоэнергетики и биопроцессов Циндао (QIBEBT) Китайской академии наук (CAS) определила ключевые факторы, ограничивающие природный потенциал цианобактерий для прямого преобразования CO₂ в глюкозу, и они построили эффективные фотосинтетические клеточные фабрики, синтезирующие глюкозу.

У фотоавтотрофов, например высших растений и водорослей, глюкоза синтезируется как хранилище углерода и энергии. Метаболизм глюкозы имеет сложные взаимодействия с фотосистемами, нарушает синтез и метаболизм пигментов и может даже ингибировать фотосинтетическую активность. Поэтому свободная глюкоза редко синтезируется или накапливается в избытке при фотосинтетическом клеточном метаболизме.

Целенаправленный нокаут двух генов глюкокиназы цианобактерии *Synechococcus elongatus* PCC 7942 нарушал углеводный обмен и активировал метаболический поток к глюкозе через сеть метаболизма сахарозы. Усиление синтеза глюкозы способствовало накоплению специфической спонтанной геномной мутации на хромосоме PCC 7942, что способствует эффективной секреции глюкозы.

Исследователи дополнительно прояснили пути и мутации, ведущие к синтезу и секреции глюкозы, и оптимизировали характеристики синтеза глюкозы у рекомбинантных штаммов. Благодаря последующей метаболической инженерии и оптимизации культивирования глюкоза, секретируемая сконструированным штаммом, превышает 5 г/л при длительном культивировании, что составляет до 70% фиксированного источника углерода.

Эти результаты проливают свет на разработку и промышленное внедрение более направленных и непрерывных систем производства глюкозы с использованием солнечной энергии и углекислого газа.



Zhang S, Sun J, Feng D, et al.
Unlocking the potentials of cyanobacterial photosynthesis for directly converting carbon dioxide into glucose.
Nat Commun. 2023 Jun 9;14(1):3425. DOI: 10.1038/s41467-023-39222-w

Оценка качества отечественных питательных сред для культивирования термофильных кампилобактерий

О.В.Полосенко, Л.П.Домотенко, И.С.Косилова, М.В.Храмов

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

Бактерии рода *Campylobacter* вызывают кампилобактериоз – острое кишечное заболевание пищевого происхождения. Нормативно-методические документы регламентируют использование питательных сред при микробиологической диагностике кампилобактериоза, а также при анализе пищевой продукции и смывов с объектов окружающей среды. Способность кампилобактерий переходить под влиянием стрессовых воздействий в некультивируемые формы создает проблемы для получения объективной оценки степени контаминации исследуемых объектов.

Цель исследований – сравнительная оценка качества отечественных плотных питательных сред и бульонов при восстановлении штаммов термофильных кампилобактерий из лиофилизированного состояния.

Материалы и методы. В работе использовали референтные и ранее выделенные из биологического материала птиц штаммы термофильных кампилобактерий *C. jejuni* ATCC 33560, *C. coli* ATCC 33559, *C. jejuni* F-2, *C. jejuni* Ph-15, *C. coli* V-2, полученные из коллекции «ГКПМ-Оболенск».

Результаты. При восстановлении исследуемых штаммов из лиофилизированного состояния на всех плотных питательных средах, за исключением среды ЖЭКА, получены достоверно сравнимые результаты. Рост штамма *C. jejuni* Ph-15 обеспечивал только железо-эритрит-кровяной агар с кровью и азотолерантной добавкой.

При расчете показателей эффективности всех используемых бульонов обнаружено, что по ростовым свойствам бруцелла-бульон с кровью и азотолерантной добавкой превосходит бруцелла-бульон без добавок, не уступает бульону Престона с кровью и азотолерантной добавкой и обеспечивает накопление штаммов *C. jejuni* Ph-15 и *C. coli* V-2 с показателем эффективности не менее чем 100 000 и 80 000 соответственно.

Заключение. Анализ плотных питательных сред показал, что они сравнимы по качественным характеристикам и способны заменить друг друга при культивировании термофильных кампилобактерий. Оценка ростовых свойств накопительных бульонов показала, что самый высокий показатель эффективности отмечен для бульонов с кровью и азотолерантной добавкой. Использование бруцелла-бульона с кровью и азотолерантной добавкой будет предпочтительнее при низкой нагруженности патогеном исследуемых образцов.

Ключевые слова: бактерии рода *Campylobacter*, кампилобактериоз, питательные среды, накопительные бульоны, эффективность

Для цитирования: Полосенко О.В., Домотенко Л.П., Косилова И.С., Храмов М.В. Оценка качества отечественных питательных сред для культивирования термофильных кампилобактерий. Бактериология. 2023; 8(2): 20–26. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-20-26

Evaluation of Russia-made nutrient media for culturing thermophilic *Campylobacter*

O.V.Polosenko, L.P.Domotenko, I.S.Kosilova, M.V.Khramov

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

Campylobacter spp. are bacteria responsible for campylobacteriosis, an acute intestinal foodborne disease. Regulatory and methodological papers are governing the use of nutrient media for carrying out microbiological diagnostics of campylobacteriosis, as well as for analyzing foods and rinses from environmental objects. The ability of campylobacteria to switch under stress to uncultivable forms prevents researchers from assessing the actual extent of contamination of analyzable objects.

Для корреспонденции:

Косилова Ирина Сергеевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред 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) 31-21-70
E-mail: kosilova.irina@gmail.com

Статья поступила 02.04.2023, принята к печати 30.06.2023

For correspondence:

Irina S. Kosilova, PhD in Biology, Researcher, Nutrient Medium Development Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 31-21-70
E-mail: kosilova.irina@gmail.com

The article was received 02.04.2023, accepted for publication 30.06.2023

The objective of the research is to compare the quality of Russia-made solid and broths nutrient media being used to revive lyophilized thermophilic campylobacter strains.

Materials and methods. Referent and previously isolated avian strains of thermophilic campylobacteria *C. jejuni* ATCC 33560, *C. coli* ATCC 33559, *C. jejuni* F-2, *C. jejuni* Ph-15, and *C. coli* V-2 were used in the research. The strains were provided by the Obolensk GCPM collection.

Results. Reviving the lyophilized strains gave reliably comparative results for all solid nutrient media except for iron-erythritol-blood agar (IEBA). The *C. jejuni* Ph-15 strain grew only on iron-erythritol-blood agar supplemented with blood and an aerotolerant additive.

When calculating efficiency indexes for all used broths, it was found that in terms of growth properties *Brucella* broth with blood and an aerotolerant additive is superior to additives-free *Brucella* broth, is not inferior to Preston broth with blood and an aerotolerant additive, and provides enrichment of *C. jejuni* Ph-15 and *C. coli* V-2 strains with efficiency indexes of at least 100,000 and 80,000, respectively.

Conclusion. The analysis of the solid nutrient media showed that they are comparable in quality characteristics and may replace each other upon culturing thermophilic campylobacteria. The evaluation of the growth properties of enrichment broths revealed the highest efficiency index for broths added with blood and an aerotolerant additive. The *Brucella* broth plus blood and an aerotolerant additive is preferable if the pathogen load of the analyzable samples is low.

Key words: *Campylobacter bacteria*, campylobacteriosis, nutrient media, enrichment broths, efficiency

For citation: Polosenko O.V., Domotenko L.P., Kosilova I.S., Khranov M.V. Evaluation of Russia-made nutrient media for culturing thermophilic *Campylobacter*. Bacteriology. 2023; 8(2): 20–26. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-20-26

Введение

Кампилобактериоз в настоящее время представляет важную проблему здравоохранения со значительными социально-экономическими последствиями, а представители бактерий рода *Campylobacter* расцениваются как одни из ведущих возбудителей острых кишечных инфекций, поражающих ежегодно миллионы человек в индустриально развитых и развивающихся странах, нанося огромные экономические убытки государствам [1–3].

В инфекционной патологии человека важнейшую роль играют виды *C. jejuni* и *C. coli*, объединенные в группу термофильных кампилобактеров на основании способности к росту при относительно высокой температуре инкубации ($42 \pm 0,5^\circ\text{C}$) [3–6].

Лабораторная диагностика кампилобактериозов, вызванных термофильными кампилобактериями, и выявление их в пищевых продуктах, объектах окружающей среды, смывах проводятся с использованием микробиологических, молекулярно-генетических и серологических методов диагностики. Выделение чистой культуры возбудителя на питательных средах является одним из основных методов лабораторной диагностики [7–10].

Нормативно-методические документы регламентируют использование ряда питательных сред при микробиологической диагностике кампилобактериоза, анализе пищевой продукции, воды и смывов с объектов окружающей среды. Бактериологическое исследование клинического материала в соответствии с методическими рекомендациями предусматривает посев испражнений непосредственно на агаризованные питательные среды (кровяной эритролит-агар, угольный эритролит-агар, кампилобакагар) с использованием добавок: аэротолерантных (железа II сульфат, натрия пируват, натрия метабисульфит) и селективных (смеси антибиотиков рифампицин, фузидин, амфотерицин В, цефалотин, цефоперазон, триметоприм, полимиксин В, ристомицин, цефалексин, триметоприм в разных комбинациях) [11].

При лабораторной диагностике кампилобактериоза у детей рекомендованы к использованию питательные среды Muller Hinton agar, Columbia agar base, эритролит-агар, триптоз-

ный агар, среда без крови CCDA с цефоперазоном, среды Campy I.C., Campy BAP, ЖЭКА (железо-эритролит-кровяной агар) [12].

Процедура выявления *Campylobacter* в образцах пищевых продуктов, сырья, смывах отличается сложностью из-за высокого уровня микробного загрязнения образцов. На общем микробном фоне исследуемого объекта количество патогенов бывает, как правило, незначительным, поэтому их прямое культивирование оказывается невозможным, в связи с чем возникает необходимость применения специальных методов обогащения [13].

Методология обнаружения бактерий рода *Campylobacter* в пищевой продукции регламентирована и предусматривает предварительный посев определенных количеств продукта в среды обогащения (накопления) [14–16]. В качестве таких сред используют бульоны Престона, Болтона, Дойла и бульон для бруцелл. Для повышения селективности вносят антибиотики, а для улучшения ростовых свойств – аэротолерантные добавки. Затем осуществляют пересев на агаризованные селективно-диагностические среды, регламентированные стандартами, с целью выделения чистой культуры. Дальнейшая идентификация изолятов проводится по совокупности культуральных, морфологических и биохимических признаков, определяющих принадлежность к бактериям рода *Campylobacter*.

Сравнительному изучению качества агаризованных питательных сред для выделения кампилобактерий различных производителей посвящен ряд статей как отечественных, так и зарубежных авторов [7–13, 17–19]. В работах зарубежных авторов имеются сведения по эффективности обогащающих бульонов Болтона, Престона, Дойла, Романа, определяемой при проведении бактериологических исследований в санитарной и клинической микробиологии [20–22]. В работах отечественных авторов упоминается использование бульона Престона с кровью и бульон для бруцелл лабораторного изготовления для транспортирования и накопления кампилобактеров при исследовании смывов с поверхностей оборудования и объектов внешней среды [23].

Цель исследований – сравнительная оценка качества отечественных плотных питательных сред и бульонов при вос-

становлении штаммов термофильных кампилобактерий из лиофилизированного состояния.

Материалы и методы

В работе использованы агаризованные питательные среды производства ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболensk): среда ЖЭКА, приготовленная из основы железо-эритрит-кровяного агара для выделения кампилобактерий (РУ № РЗН 2022/16301) с внесением крови и аэротолерантной добавки (АД); колумбийский агар (РУ № РЗН 2020/12505) в двух вариантах: с внесением крови и с внесением крови + АД; питательный бульон для культивирования возбудителя бруцеллеза (бруцелла-бульон, РУ №РЗН 2015/2948); бруцелла-бульон с внесением крови + АД; питательная среда для культивирования и выделения кампилобактерий (кампилобакагар, основа по ТУ 20.59.52-288-78095326-2018) с внесением крови. Питательные среды готовили в соответствии с инструкциями производителя.

В работе использовали агар и бульон Престона лабораторного приготовления, которые готовили по рецептурам, изложенным в методических руководствах и нормативных документах, с внесением крови + АД [24].

Для приготовления кровяных сред использовали стерильную дефибринированную баранью кровь («Эколаб») из расчета 70 мл/л среды и аэротолерантную добавку, состоящую из метабисульфита натрия – 0,025 г/л, натрия пировинограднокислого – 0,025 г/л и железа (II) сернокислого 7-водного – 0,025 г/л.

Для контроля питательных сред использовали музейные штаммы: референтные *C. jejuni* ATCC 33560 и *C. coli* ATCC 33559, а также ранее выделенные из биологического материала птиц фермерского хозяйства Московской области штаммы *C. jejuni* F-2 (чувствительный к ципрофлоксацину, эритромицину и тетрациклину), *C. jejuni* Ph-15 (устойчивый к ципрофлоксацину, эритромицину и тетрациклину), *C. coli* V-2 (устойчивый к ципрофлоксацину), депонированные в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk». Все штаммы получены из коллекции в лиофилизированном виде.

Посевы на плотных питательных средах инкубировали в течение 48 ч при температуре $42 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в микроаэрофильных условиях, а в бульонах – сначала при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 4 ч, затем – при температуре $42 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 18 ч в микроаэрофильных условиях в соответствии с требованиями МУ 4.2.3545-18.

Микроаэрофильные условия обеспечивали при помощи газогенерирующих пакетов GasPak (BD, кат. № 260680) с использованием анаэростана «АЭ-01» (ООО «НИКИ МЛТ»).

Показатель эффективности – (прирост) числа микроорганизмов в накопительной среде – определяли в соответствии с нормативными документами [25] по формуле (%):

$$\Theta = \frac{n_t \times K}{n_o},$$

где Θ – показатель эффективности (прирост);

n_t – среднее число колоний на чашках после инкубации культуры в жидкой накопительной среде;

n_o – среднее число колоний при «нулевом посеве»;

K – степень разведения.

Результаты

1. Оценка качества питательных сред при восстановлении штаммов кампилобактерий из лиофилизированного состояния

Восстановление исследуемых штаммов *C. jejuni* ATCC 33560, *C. coli* ATCC 33559, *C. jejuni* F-2, *C. jejuni* Ph-15 и *C. coli* V-2 из лиофилизированного состояния проводили путем суспендирования их в физиологическом растворе, титрования полученной суспензии в бруцелла-бульоне до разведения 10^{-6} и последующего высева на плотные и жидкие питательные среды. Исходные концентрации микробных взвесей всех штаммов перед лиофилизацией составляли $\sim 10^9$ клеток/флакон. Для определения показателя эффективности жидких накопительных сред использовали только штаммы *C. jejuni* F-2, *C. jejuni* Ph-15 и *C. coli* V-2.

Качество питательных сред оценивали по максимальному разведению микробной суспензии, при посеве из которого визуально обнаруживался типичный рост микроорганизмов.

Таблица 1. Ростковые свойства плотных питательных при посеве исследуемых штаммов *Campylobacter*
 Table 1. Growth characteristics of solid nutrient media when culturing analyzable *Campylobacter* strains

Питательные среды / Nutrient media	Количество и размер (мм) колоний штаммов кампилобактерий, выросших из максимальных разведений лиофилизированных культур / The number and size (mm) of colonies of campylobacter strains grown using maximum dilutions of lyophilized cultures				
	<i>C. jejuni</i> Ph-15 10 ⁻¹	<i>C. jejuni</i> F-2 10 ⁻⁴	<i>C. coli</i> V-2 10 ⁻⁴	<i>C. jejuni</i> ATCC 33560 10 ⁻⁶	<i>C. coli</i> ATCC 33559 10 ⁻⁶
Кампилобакагар с кровью / <i>Campylobacter</i> agar and blood	роста нет	40 (1,0–1,2)	44 (1,2–1,6)	59 (1,2–1,4)	55 (1,4–1,8)
Колумбийский агар с кровью / <i>Columbia</i> agar and blood	роста нет	38 (1,2–1,4)	36 (1,2–1,6)	58 (1,2–1,4)	52 (1,4–1,8)
Колумбийский агар с кровью + АД / <i>Columbia</i> agar and blood + AA	роста нет	36 (1,2–1,4)	41 (1,2–1,6)	60 (1,2–1,4)	63 (1,4–1,8)
Агар Престона с кровью + АД / <i>Preston</i> agar and blood + AA	роста нет	35 (1,2–1,4)	39 (1,2–1,6)	56 (1,2–1,4)	58 (1,4–1,8)
ЖЭКА с кровью + АД / <i>IEBA</i> and blood + AA	22 (1,2–1,4)	38 (1,2–1,4)	46 (1,2–1,6)	60 (1,2–1,4)	65 (1,4–1,8)

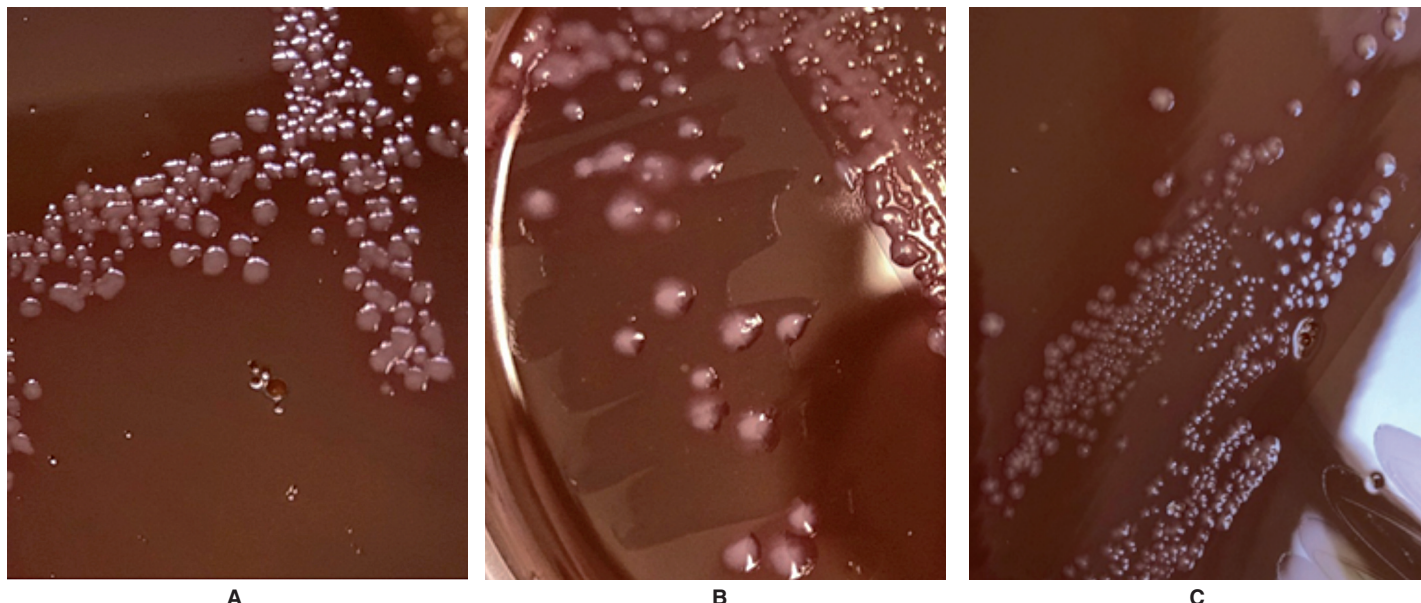


Рисунок. Рост штаммов кампилобактерий на среде ЖЭКА после инкубации посевов при $42 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 48 ч: А – *C. jejuni* ATCC 33560; В – *C. coli* ATCC 33559; С – *C. jejuni* Ph-15.

Fig. The growth of campylobacterial strains on IEBA after incubation at $42 \pm 0,5^\circ\text{C}$ for 48 h: А – *C. jejuni* ATCC 33560; В – *C. coli* ATCC 33559; С – *C. jejuni* Ph-15.

Посевы штаммов на плотные питательные среды осуществляли по 0,1 мл, а в бульоны – по 1,0 мл, инокулируя в 9,0 мл питательной среды.

Плотные питательные среды

Результаты посевов исследуемых штаммов кампилобактерий на плотные питательные среды представлены в табл. 1.

Рост тест-штаммов *C. jejuni* ATCC 33560 и *C. coli* ATCC 33559 обнаруживался на всех используемых питательных средах из разведения 10^{-6} . *C. jejuni* ATCC 33560 вырастали в виде круглых, полупрозрачных с сероватым оттенком, блестящих колоний диаметром 1,2–1,4 мм; *C. coli* ATCC 33559 – в виде плоских полупрозрачных колоний, растекающихся по поверхности среды, с краями неправильной формы, диаметром 1,4–1,8 мм.

Рост штаммов *C. jejuni* F-2 и *C. coli* V-2 наблюдался из разведения 10^{-4} в виде гладких полупрозрачных с сероватым оттенком колоний диаметром 1,2–1,6 мм на всех испытуемых питательных средах. Рост штамма *C. jejuni* Ph-15 отмечен только на среде ЖЭКА из разведения 10^{-1} в виде полупрозрачных серых колоний диаметром 1,2–1,4 мм.

Рост некоторых тест-штаммов кампилобактерий на среде ЖЭКА продемонстрирован на рисунке (штриховой посев).

Жидкие накопительные среды (бульоны)

При восстановлении штаммов кампилобактерий из лиофилизированного состояния в бруцелла-бульоне визуальный рост в виде равномерного помутнения обнаружен только для *C. jejuni* F-2. После инкубации посевов *C. jejuni* Ph-15 и *C. coli* V-2 в бруцелла-бульоне не наблюдалось признаков роста. Отсутствие роста культур подтверждено высевом бульона на среду ЖЭКА.

Визуально оценить рост в кровяном бульоне Престона было невозможно из-за высокой мутности среды. При пересеве культуральной жидкости штаммов *C. jejuni* F-2, *C. jejuni* Ph-15 и *C. coli* V-2 на среду ЖЭКА наблюдался интенсивный рост кампилобактерий.

Учитывая полученные результаты, для проведения дальнейшей работы приготовили обогащенный вариант бруцелла-бульона, в который вносили кровь и АД по аналогии с бульоном Престона. Такой вариант бульона, на наш взгляд, будет предпочтительнее при низкой нагруженности патогеном образцов пищевых продуктов и объектов окружающей среды.

2. Определение эффективности бульонов

Оценку эффективности проводили для трех бульонов: бульона Престона, бруцелла-бульона и бруцелла-бульона с кровью + АД, с использованием антибиотикоустойчивых штаммов *C. jejuni* Ph-15 и *C. coli* V-2. Для этого культуры с бульона Престона высевали на среду ЖЭКА. Выросшие в течение 48 ч при температуре $42 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в микроаэрофильных условиях культуры каждого штамма использовали для приготовления стандартной взвеси, соответствующей 10 единицам по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-85 П (ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ), в стерильном 0,9%-м растворе натрия хлористого. Полученные взвеси культур титровали в бруцелла-бульоне до разведений 10^{-1} – 10^{-6} . По 1 мл каждого разведения вносили в 9 мл бульона Престона и бруцелла-бульона. Из пробирок со средами, засеянными из разведений 10^{-6} , проводили посев по 0,1 мл на среду ЖЭКА для определения концентрации микробных суспензий («нулевой» посев).

После инкубации засеянных бульонов, независимо от видимых изменений, осуществляли ряд десятикратных разведений содержимого каждой пробирки в бруцелла-бульоне, вплоть до разведения 10^{-6} , после чего производили высеивание на чашки со средой ЖЭКА (по 0,1 мл на чашку).

При учете результатов выбирали те разведения, при которых на среде ЖЭКА выросло не более 100 колоний. Для штамма *C. jejuni* Ph-15 в бульоне Престона учитывали разведение 10^{-4} , в бруцелла-бульоне с кровью + АД – 10^{-5} , в бруцелла-бульоне – 10^{-2} . Для штамма *C. coli* V-2 в бульоне

Таблица 2. Показатель эффективности накопительных сред при посеве штаммов *C. jejuni* Ph-15 и *C. coli* V-2
 Table 2. The efficacy index for enrichment nutrient media when culturing *C. jejuni* Ph-15 and *C. coli* V-2 strains

Накопительные среды / <i>Enrichment media</i>	Количество выросших колоний на ЖЭКА после высева из бульонов / <i>The number of colonies grown on IEBA after broth plating</i>		Показатель эффективности / <i>Efficiency index</i>
	«Нулевой» посев / «zero» culture	После инкубации / post-incubation	
<i>C. jejuni</i> Ph-15			
Бульон Престона с кровью + АД / <i>Preston broth and blood + AA</i>	73 ± 5	57 ± 5	7808 ± 141
Бруцелла-бульон с кровью + АД / <i>Brucella broth and blood + AA</i>	70 ± 6	80 ± 7	114285 ± 195
Бруцелла-бульон / <i>Brucella broth</i>	69 ± 4	49 ± 2	71 ± 1
<i>C. coli</i> V-2			
Бульон Престона с кровью + АД / <i>Preston broth and blood + AA</i>	50 ± 4	27 ± 2	54000 ± 290
Бруцелла-бульон с кровью + АД / <i>Brucella broth and blood + AA</i>	53 ± 3	44 ± 2	83018 ± 860
Бруцелла-бульон / <i>Brucella broth</i>	48 ± 3	51 ± 4	106 ± 2

Престона учитывали разведение 10^{-5} , в бруцелла-бульоне с кровью и АД – 10^{-5} , в бруцелла-бульоне – 10^{-2} . Степень разведения учитывали при обработке результатов.

Рассчитанные показатели эффективности для трех бульонов по формуле, приведенной в разделе «Материалы и методы», представлены в табл. 2.

Обсуждение

При восстановлении исследуемых штаммов кампилобактерий, кроме *C. jejuni* Ph-15, из лиофилизированного состояния все агаризованные питательные среды (среда ЖЭКА, колумбийский агар с кровью, колумбийский агар с кровью + АД, кампилобакагар с кровью, агар Престона с кровью + АД) показали достоверно сравнимые результаты. Они обеспечивали рост референтных штаммов *C. jejuni* ATCC 33560, *C. coli* ATCC 33559 из разведения 10^{-6} , а *C. jejuni* F-2 и *C. coli* V-2 – из 10^{-4} . Штамм *C. jejuni* Ph-15 восстановлен только на питательной среде ЖЭКА.

При использовании накопительных бульонов восстановление лиофилизированных штаммов микроорганизмов наблюдалось только на бульоне с кровью + АД. Сравнительный анализ бульонов без крови и с кровью + АД показал, что для штамма *C. jejuni* Ph-15 показатель эффективности бульона Престона с кровью + АД, бруцелла-бульона с кровью + АД и бруцелла-бульона составил 7808 ± 141, 114285 ± 195 и 71 ± 1 соответственно. При росте штамма *C. coli* V-2 показатель эффективности бульона Престона с кровью + АД составил 54000 ± 290, бруцелла-бульона с кровью + АД – 83018 ± 860, а бруцелла-бульона – 106 ± 2.

Как показали результаты исследования, бруцелла-бульон с кровью и АД превосходит бруцелла-бульон без добавок, не уступает бульону Престона и обеспечивает накопление *C. jejuni* Ph-15 и *C. coli* V-2 с показателем эффективности не менее чем 100 000 и 80 000 соответственно.

Таким образом, сравнительный анализ бульонов по показателю эффективности показал, что значительное накопление термофильных штаммов кампилобактерий наблюдалось на бульонах, содержащих кровь и аэротолерантные добавки.

Заключение

Сравнительная оценка ростовых свойств питательных сред показала, что плотные питательные среды кампилобак-агар с кровью, среда ЖЭКА, среда Престона и колумбийский агар с кровью и АД сравнимы по качественным характеристикам и способны заменить друг друга при культивировании термофильных кампилобактерий.

С целью повышения эффективности накопления бактерий рода *Campylobacter* модифицированы рецептуры традиционно используемых бульонов. Применение эффективных накопительных питательных сред с улучшенными ростовыми свойствами, таких как бруцелла-бульон с кровью и АД, при исследовании объектов, имеющих незначительное количество кампилобактерий, позволит повысить качество и достоверность лабораторных исследований с целью их выявления.

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.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was supported by the Sectoral Scientific Program of Rosпотребнадзор.

Литература

- Гритчина АВ, Мишук ВИ, Пожалостина ЛВ. Кампилобактериоз: роль в инфекционной патологии человека. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2006;6(31):38-41.
- Бехтерева МК, Ныркова ОИ, Сиземов АН. Кампилобактериоз. Педиатр. 2012;3(3):102-109.
- Горелов АВ. Кампилобактериоз у детей. Инфекционные болезни. 2004;2(3):80-82.

4. Ефимочкина НР. Оценка роли бактерий рода *Campylobacter* в возникновении пищевых токсикоинфекций и современные методы обнаружения возбудителя. Вопросы питания. 2015;84(6):5-18.
5. Costa D, Iraola G. Pathogenomics of Emerging *Campylobacter* Species. Clin Microbiol Rev. 2019 Jul 3;32(4):e00072-18. DOI: 10.1128/CMR.00072-18
6. Стеценко ВВ, Ефимочкина НР. Механизмы формирования антибиотикорезистентности бактерий рода *Campylobacter*. Антибиотики и химиотерапия. 2018;63(9-10):61-68.
7. Попова АЮ, Дятлов ИА. Микробиологический контроль качества пищевой продукции. М.: Династия; 2020.
8. Шепелин АП, Полосенко ОВ. Выявление кампилобактерий культуральным методом. Справочник заведующего КДЛ. 2022;1:25-35.
9. Кремлева АА, Скоморина ЮА, Ахметова ЛШ, Подольская ТВ, Шепелин АП, Полосенко ОВ. Сравнительный анализ питательных сред отечественных и зарубежных производителей для выделения кампилобактерий. Бактериология. 2021;6(2):32-37. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-2-32-37
10. Полосенко ОВ, Шепелин АП, Марчихина ИИ, Шолохова ЛП. Разработка питательной среды для выделения кампилобактерий. Бактериология. 2021;6(3):60.
11. МУ 01/15702-8-34. Микробиологическая диагностика кампилобактериоза. Методические рекомендации. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008.
12. Ефимочкина НР, Пичугина ТВ, Стеценко ВВ, Быкова ИБ, Маркова ЮМ, Короткевич ЮВ, и др. Оптимизация методов контроля пищевых продуктов на основе создания дифференциально-диагностических сред для выделения и культивирования бактерий рода *Campylobacter*. Вопросы питания. 2017;86(5):34-41.
13. Шевелёва СА, Ефимочкина НР, Пичугина ТВ, Быкова ИБ, Стеценко ВВ, Маркова ЮМ, и др. Ускоренные методы обнаружения бактерий рода *Campylobacter* в пищевых продуктах. Гигиена и санитария. 2018;97(10):995-1000. DOI: 10.18821/0016-9900-2018-97-10-995-1000
14. МУ 4.2.3545-18. Методы ускоренного определения бактерий рода *Campylobacter* в пищевой продукции и оценка их антибиотикорезистентности. Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2019.
15. МУК 4.2.2321-08. Методы определения бактерий рода *Campylobacter* в пищевых продуктах: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008.
16. ГОСТ ISO 10272-1-2013. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы обнаружения и подсчета бактерий *Campylobacter* spp. Часть 1. Метод обнаружения. М.: Стандартинформ, 2013.
17. Corry JE, Post DE, Colin P, Laisney MJ. Culture media for the isolation of campylobacters. Int J Food Microbiol. 1995 Jun;26(1):43-76. DOI: 10.1016/0168-1605(95)00044-k
18. Acke E, McGill K, Golden O, Jones BR, Fanning S, Whyte P. A comparison of different culture methods for the recovery of *Campylobacter* species from pets. Zoonoses Public Health. 2009 Nov;56(9-10):490-5. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2008.01205.x
19. Butzler JP, Skirrow MB. *Campylobacter* enteritis. Clin Gastroenterol. 1979 Sep;8(3):737-65.
20. Heisick J. Comparison of enrichment broths for isolation of *Campylobacter jejuni*. Appl Environ Microbiol. 1985 Nov;50(5):1313-4. DOI: 10.1128/aem.50.5.1313-1314.1985
21. Hodge DS, Terro R. Comparative efficacy of liquid enrichment medium for isolation of *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol. 1984 Mar;19(3):434. DOI: 10.1128/jcm.19.3.434-1984
22. Bi S-I, Shi L, Yan H, Meng H-C. Comparison of various culture methods (Skirrow medium, a blood-free medium and a filtration system enriched in Bolton and Preston broths) for isolation of *Campylobacter* spp. from raw meat samples. Annals of Microbiology. 2013;63(1):179-185. DOI: 10.1007/s13213-012-0459-y
23. Ефимочкина НР, Быкова ИБ, Стеценко ВВ, Минаева ЛП, Пичугина ТВ, Маркова ЮМ, и др. Изучение характера контаминации и уровней содержания бактерий рода *Campylobacter* в отдельных видах пищевой продукции. Вопросы питания. 2016;85(5):52-59.
24. МУК 4.2.2959. Методы санитарно-микробиологического и санитарно-паразитологического анализа прибрежных вод морей в местах водопользования населения: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.
25. МУК 4.2.2316-08. Методы контроля бактериологических питательных сред: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008.

References

1. Gritchina AV, Mishchuk VI, Pozhalostina LV. Campylobacteriosis: role in human infectious pathology. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2006;6(31):38-41. (In Russian).
2. Bekhtereva MK, Nyrkova OI, Sizemov AN. Campylobacteriosis. Pediatrician (St. Petersburg). 2012;3(3):102-109. (In Russian).
3. Gorelov AV. Campilobacteriosis in children. Infekc. bolezni (Infectious Diseases). 2004;2(3):80-82. (In Russian).
4. Efimochkina NR. Evaluation of the role of bacteria of the genus *Campylobacter* in the occurrence of food toxic infections and modern methods for detecting the pathogen. Problems of Nutrition. 2015;84(6):5-18. (In Russian).
5. Costa D, Iraola G. Pathogenomics of Emerging *Campylobacter* Species. Clin Microbiol Rev. 2019 Jul 3;32(4):e00072-18. DOI: 10.1128/CMR.00072-18
6. Stetsenko VV, Efimochkina NR. The mechanisms of antibiotic resistance in bacteria of the genus *Campylobacter*. Antibiotics and Chemotherapy. 2018;63(9-10):61-68. (In Russian).
7. Popova AYU, Dyatlov IA. Mikrobiologicheskii kontrol' kachestva pishchevoi produktsii. Moscow: «Dinastiya» Publ.; 2020. (In Russian).
8. Shepelin AP, Polosenko OV. Detection of *Campylobacter* by culture method. Spravochnik zaveduyushchego KDL. 2022;1:25-35. (In Russian).
9. Kremleva AA, Skomorina YuA, Akhmetova LSh, Podol'skaya TB, Shepelin AP, Polosenko OV. Comparative analysis of medium for isolation of *Campylobacter* spp. of domestic and foreign producers. Bacteriology. 2021;6(2):32-37. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-2-32-37 (In Russian).
10. Полосенко ОВ, Шепелин АП, Марчихина ИИ, Шолохова ЛП. Разработка питательной среды для выделения кампилобактерий. Бактериология. 2021;6(3):60. (In Russian).
11. МУ 01/15702-8-34. Microbiological diagnostics of campylobacteriosis. Methodological recommendations. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor, 2008. (In Russian).
12. Efimochkina NR, Pichugina TV, Stetsenko VV, Bykova IB, Markova YuM, Korotkevich YuV, et al. Optimization of microbiological methods for food control based on the differential-diagnostic media for the isolation and cultivation of bacteria of the genus *Campylobacter*. Problems of Nutrition. 2017;86(5):34-41. (In Russian).
13. Sheveleva SA, Efimochkina NR, Pichugina TV, Bykova IB, Stetsenko VV, Markova YuM, et al. Accelerated methods for detecting bacteria of the genus *Campylobacter* in food. Hygiene and Sanitation. 2018;97(10):995-1000. DOI: 10.18821/0016-9900-2018-97-10-995-1000 (In Russian).
14. МУ 4.2.3545-18. Methods for the accelerated determination of bacteria of the genus *Campylobacter* in food products and the assessment of their antibiotic resistance. Moscow: Federal Center of Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor, 2019. (In Russian).
15. МУК 4.2.2321-08. Methods for the determination of bacteria of the genus *Campylobacter* in food products. Moscow: Federal Center of Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor, 2008. (In Russian).

16. GOST ISO 10272-1-2013. Microbiology of food and animal feed. Methods for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1. Method of detection. Moscow: «Standartinform» Publ.; 2013. (In Russian).
17. Corry JE, Post DE, Colin P, Laisney MJ. Culture media for the isolation of campylobacters. Int J Food Microbiol. 1995 Jun;26(1):43-76. DOI: 10.1016/0168-1605(95)00044-k
18. Acke E, McGill K, Golden O, Jones BR, Fanning S, Whyte P. A comparison of different culture methods for the recovery of *Campylobacter* species from pets. Zoonoses Public Health. 2009 Nov;56(9-10):490-5. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2008.01205.x
19. Butzler JP, Skirrow MB. *Campylobacter* enteritis. Clin Gastroenterol. 1979 Sep;8(3):737-65.
20. Heisick J. Comparison of enrichment broths for isolation of *Campylobacter jejuni*. Appl Environ Microbiol. 1985 Nov;50(5):1313-4. DOI: 10.1128/aem.50.5.1313-1314.1985
21. Hodge DS, Terro R. Comparative efficacy of liquid enrichment medium for isolation of *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol. 1984 Mar;19(3):434. DOI: 10.1128/jcm.19.3.434-1984
22. Bi S-I, Shi L, Yan H, Meng H-C. Comparison of various culture methods (Skirrow medium, a blood-free medium and a filtration system enriched in Bolton and Preston broths) for isolation of *Campylobacter* spp. from raw meat samples. Annals of Microbiology. 2013;63(1):179-185. DOI: 10.1007/s13213-012-0459-y
23. Efimochkina NR, Bykova IB, Stetsenko VV, Minaeva LP, Pichugina TV, Markova YuM, et al. The study of the contamination and the levels of *Campylobacter* spp. during the processing of selected types of foods. Problems of Nutrition. 2016;85(5):52-59. (In Russian).
24. MUK 4.2.2959. Methods of sanitary-microbiological and sanitary-parasitological analysis of coastal waters of the seas in places where the population uses water: Methodological guidelines. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor, 2011. (In Russian).
25. MUK 4.2.2316-08 Methods of control of bacteriological nutrient media: Guidelines. Moscow: Federal Center of Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor, 2008. (In Russian).

Информация о соавторах:

Полосенко Ольга Вадимовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологических и физико-химических методов анализа ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Домотенко Любовь Викторовна, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред 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:

Olga V. Polosenko, PhD in Biology, Leading Researcher, Microbiological And Physic-Chemical Methods Of Analysis Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

Lyubov V. Domotenko, PhD in Chemistry, Leading Researcher, Nutrient Medium Development Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

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

НОВОСТИ НАУКИ

Устойчивость к противомикробным препаратам нетифозной сальмонеллы в Китае

Нетифоидная сальмонелла (NTS) является основной причиной сальмонеллеза человека во всем мире. Пищевые животные являются основными резервуарами NTS. Повышение устойчивости к противомикробным препаратам (УПП) при НТС пищевого происхождения привело к неэффективности клинического лечения. Чтобы изучить распространенность и дать характеристику NTS пищевого происхождения с УПП в Китае, протестировали чувствительность к противомикробным препаратам 1256 изолятов NTS, выделенных из розничных пищевых продуктов в 2020 году в Китае.

Чувствительность к противомикробным препаратам 26 противомикробных препаратов, представляющих 12 классов, оценивали методом бульонных микроразведений; наличие десяти генов *mcr* проверяли с помощью мульти-ПЦР. Полные закрытые геномы изолятов, несущих ген *mcr*, были созданы путем гибридной сборки путем полногеномного секвенирования на платформах PacBio и Illumina. Были проанализированы геномные особенности и генетическое окружение гена *mcr-1*.

Общая лекарственная устойчивость составила 92,28%, а множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) – 76,53%. Всего был определен 341 профиль AMR, при этом устойчивость была самой высокой к налидиксовой кислоте (63,38%). Среди 887 изолятов NTS с МЛУ 232 показали резистентность к цефотаксиму и ципрофлоксацину, а 25 были устойчивы к десяти классам противомикробных препаратов. Устойчивость НТС, выделенных из разных регионов, неодинакова. Наиболее часто резистентность проявляли изоляты из сырых куриных источников. Четыре NTS несли ген *mcr-1* и представляли четыре разных серотипа. Четыре плазмиды, несущие ген *mcr-1*, из четырех изолятов *Salmonella* были классифицированы по двум типам репликонов (*IncI2* и *IncHI2A*). Было обнаружено, что два гена *mcr-1* в плазмидах типа *IncI2* расположены между геном, кодирующим белок семейства PAP2, и геном, кодирующим релаксазу, тогда как две другие структуры гена *mcr-1* в плазмидах типа *IncHI2A* показали вариации в присутствии вставок.

Эти данные продемонстрировали тяжелую УПП среди НТС пищевого происхождения, выделенных из пищевых продуктов в Китае, что подчеркивает важность эпиднадзора за чувствительностью к противомикробным препаратам для снижения распространения УПП, особенно к критически важным лекарственным средствам в медицине.

Yujie Hu, Chenxi Zhang, Jing Zhang, et al.
Antimicrobial Resistance in Non-typhoidal Salmonella from Retail Foods Collected in 2020 in China. Zoonoses. 2023; Vol. 3(1). DOI: 10.15212/ZOONOSSES-2023-0001

Детекция и типирование боррелий в Тульской области.

Сообщение 1. Клеши, снятые с людей

Т.В.Решетняк¹, И.Ю.Щит¹, С.Ф.Бикетов¹, И.Г.Говорунов¹, Т.В.Козлова², А.В.Фольмер¹

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

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Тульской области», Тула, Российская Федерация

Исследовали клещей, снятых с людей в Тульской области в период 2010–2016 гг. Основная масса материалов для исследования поступила из Ефремовского (69,5%), Плавского (15,5%) и Суворовского (9%) районов. Люди подвергались укусам клещей двух видов – *Ixodes ricinus* и *Dermacentor reticulatus* (соответственно 92 и 8% случаев). В Ефремовском районе в изучаемый период выявлен рост числа нападений клещей *I. ricinus* на людей с максимумом в 2015 г. В Плавском районе нападений клещей этого вида было значительно меньше. В то же время в Плавском и Суворовском районах отмечена тенденция к росту числа инфицированных боррелиями клещей. Динамика числа укусов клещами *D. reticulatus* имела колебательный характер без выраженных тенденций. В клещах *I. ricinus*, зараженных боррелиями, преобладали два геновида: *Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii* – 47,59 и 37,93% от общего числа зараженных клещей соответственно.

Ключевые слова: иксодовые клещи, патогенные боррелии

Для цитирования: Решетняк Т.В., Щит И.Ю., Бикетов С.Ф., Говорунов И.Г., Козлова Т.В., Фольмер А.В. Детекция и типирование боррелий в Тульской области. Сообщение 1. Клеши, снятые с людей. Бактериология. 2023; 8(2): 27–33. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-27-33

Detection and typing of *Borrelia* in the Tula region.

Message 1. Ticks that bit people

T.V.Reshetnyak¹, I.Yu.Shchit¹, S.F.Biketov¹, I.G.Govorunov¹, T.V.Kozlova², A.V.Folmer¹

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

²Center for Hygiene and Epidemiology in the Tula Region, Tula, Russian Federation

Ticks taken from people in the Tula region in the period 2010–2016 have been studied. The bulk of materials for the study came from the Efremovsk (69.5%), Plavsk (15.5%) and Suворovsk (9%) districts. People were mainly bitten by two species of ticks – *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* (92 and 8% of cases respectively). The increasing number of tick attacks on people with a maximum in 2015 was revealed in Efremovsk district during the study period. Tick's attacks of this species were significantly less in the Plavsk district. At the same time an increasing the number of ticks infected by *Borrelia* tendency was noted in the Plavsk and Suворovsk districts. The dynamics of the number of bites by *D. reticulatus* ticks had an oscillatory character without pronounced trends. Two *Borrelia* species in *I. ricinus* infected ticks prevailed – *B. afzelii* and *B. garinii* (respectively 47.59 and 37.93% of the total number of infected ticks).

Key words: ixodid ticks, pathogenic *Borrelia*

For citation: Reshetnyak T.V., Shchit I.Yu., Biketov S.F., Govorunov I.G., Kozlova T.V., Folmer A.V. Detection and typing of *Borrelia* in the Tula region. Message 1. Ticks that bit people. Bacteriology. 2023; 8(2): 27–33. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-27-33

Для корреспонденции:

Говорунов Игорь Геннадиевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела информационных технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, городской округ Серпухов, п. Оболensk, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-00-46
Email: govorunov@obolensk.org

Статья поступила 27.05.2023, принята к печати 30.06.2023

For correspondence:

Igor G. Govorunov, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher, Information Technology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpuhkov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0046
E-mail: govorunov@obolensk.org

The article was received 27.05.2023, accepted for publication 30.06.2023

Иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ), болезнь Лайма – комплекс природно-очаговых инфекций, связанных с циркуляцией возбудителя в природной среде без участия человека. Возбудителями ИКБ являются представители геновидов 20 генотипов боррелий, входящие в комплекс *Borrelia burgdorferi sensu lato*. В Российской Федерации широко распространены геновиды *B. garinii* и *B. afzelii* [1, 2].

На территории России находится большая часть мирового ареала ИКБ, официальная регистрация которого проводится с 1992 г. [3]. В настоящее время заболевание является одним из наиболее распространенных природно-очаговых заболеваний с трансмиссивным механизмом передачи возбудителя. Болезнь характеризуется полиморфизмом клинических проявлений и склонностью к затяжному рецидивирующему течению с преимущественным поражением кожи, нервной системы, опорно-двигательного аппарата и сердечно-сосудистой системы [4, 5]. ИКБ приносит также значительный экономический и социальный ущерб.

Природные очаги этой болезни простираются по всей лесной и лесостепной зоне от западных до восточных границ России и зарегистрированы в подавляющем большинстве административно-географических субъектов, в т.ч. и на территории Тульской области. Годовая динамика боррелиоза характеризуется выраженной сезонностью, связанной с периодом активности переносчика – иксодовых клещей. Основным переносчиком боррелий на территории Тульской области является клещ *Ixodes ricinus*. Имеются данные о вовлечении в процесс циркуляции возбудителей боррелиозов и другого, массового вида – *Dermacentor reticulatus* [4, 6, 7]. Ежегодно 400–500 тыс. россиян обращаются в лечебные учреждения по поводу укусов клещей, четвертая часть пострадавших – дети до 14 лет. С начала текущего столетия и до 2019 г. эпидситуация по клещевым боррелиозам в России была напряженной. В 2020–2021 гг. наблюдался спад заболеваемости, что связывают с ограничениями передвижения людей во время эпидемии COVID-19. В 2022 г. заболеваемость клещевым боррелиозом по сравнению с предыдущим годом выросла почти вдвое. Заболевания фиксируются в 76 из 85 субъектов Российской Федерации [2, 4–13].

Так как меры иммунопрофилактики ИКБ еще не разработаны, важное место занимает применение медикаментозных средств для экстренной профилактики, которое целесообразно только при укусе инфицированным клещом, что обуславливает необходимость исследования самого клеща на наличие возбудителей инфекции [14]. Всесторонний мониторинг за эпидпроцессом, включающий изучение видового состава возбудителей ИКБ, необходим для понимания причин сложившейся эпидемической ситуации и осуществления эпидемиологического надзора за природными очагами ИКБ [15, 16].

В связи с вышеизложенным в цели настоящей работы входило определение видового состава клещей, присосавшихся к людям, а также установление их инфицированности и идентификация обнаруживаемых возбудителей ИКБ.

Материалы и методы

Исследовали клещей, снятых с людей в Тульской области после их присасывания. Период анализа – 2010–2016 гг.



Рис. 1. Физическая карта Тульской области: 1 – Ефремовский район, 2 – Плавский район, 3 – Суворовский район.

Fig. 1. Physical map of the Tula region: 1 – Efremovskiy district, 2 – Plavskiy district, 3 – Suvorovskiy district.

Сбор клещей проводился сотрудниками ФБУЗ «Центра гигиены и эпидемиологии в Тульской области». Видовую принадлежность клещей устанавливали по определителям фауны СССР [17, 18]. Клещей доставляли в сухом виде во ФБУН ГНЦ.

Идентификацию и типирование возбудителей в клещах проводили сотрудники референс-центра по лайм-боррелиозу ФБУН ГНЦ ПМБ. Клещей исследовали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием праймеров и TaqMan-зонда, гомологичных фрагменту гена 23S рРНК *B. burgdorferi* [19].

Математическую обработку данных и построение графиков проводили средствами MS Excel.

Результаты исследования и их обсуждение

В период 2010–2016 гг. были исследованы 3558 клещей, снятых с людей. Большая часть материалов для исследования поступила из трех районов области: Ефремовский – 2474 (69,5%) клещей, Плавский – 561 (15,5%), Суворовский – 330 (9%). Ефремовский и Плавский районы расположены в лесостепной части области, Суворовский – в лесной (рис. 1). Весь последующий анализ проводился именно по этим материалам.

Оказалось, что люди в основном подвергались укусам клещей двух видов – лесного (собачьего) клеща *I. ricinus* (Linnaeus, 1758) и лугового клеща *D. reticulatus* (Fabricius, 1794) – соответственно 92 и 8% от всех клещей, снятых с людей. Именно эти два вида в рассматриваемый период преобладали на территории Москвы [20].

Европейский лесной (собачий, скотский) клещ *I. ricinus* является временным эктопаразитом с длительным питани-

ем, тип нападения – пастбищно-подстерегающий. Все активные фазы жизненного цикла клеща проходят в лесной подстилке. Прокормителями различных фаз развития лесного клеща могут быть позвоночные животные многих видов. В круг хозяев клеща (стадия имаго) входят дикие (копытные, хищники, зайцеобразные) и домашние животные (крупный рогатый скот, собаки, кошки). Основными хозяевами личинок и важными прокормителями нимф, обеспечивающими само существование этих членистоногих на всем громадном пространстве их ареалов, являются мелкие млекопитающие [21, 22]. Клещ *I. ricinus* относительно легко переносит низкую влажность, поэтому может обитать в сухой и освещенной местности, подниматься по растениям над поверхностью почвы. Клеши активны с ранней весны до поздней осени [23].

Биология клещей рода *Dermacentor* отличается от биологии клещей рода *Ixodes*. Отмечают два периода их активности – весенний и осенний. Календарные даты этих периодов варьируют в зависимости от региона. Клещ обитает в открытых пространствах: луг, опушка леса, просека, обочина дороги [24]. Круг хозяев клеща аналогичен таковому у *I. ricinus* [25].

Сравнительная динамика укусов клещами *I. ricinus* в трех районах Тульской области по годам (рис. 2) показала, что в Ефремовском районе этот показатель ежегодно увеличивался, достигнув максимума в 2015 г. и несколько снизившись в 2016 г. В Плавском и Суворовском районах число укусов клещами *I. ricinus* было значительно ниже и носило колебательный характер. Характерно, что в Ефремовском районе наряду с имаго-формой на людей нападали и нимфы (от 21 до 35% случаев ежегодно). Этот факт свидетельствует, что данный регион является местом постоянного обитания данного вида.

Интересно отметить, что аналогичная ситуация с ростом количества обращений населения соседних с Тульской областью Москвы и Московской области по поводу присасывания клещей наблюдалась в 2013–2015 гг., когда число покушенных выросло почти вдвое [20].

Динамика числа укусов людей клещами *D. reticulatus* носила колебательный характер без выраженных тенденций (рис. 2).

В качестве возможных климатических факторов, способствующих росту активности клещей, можно назвать температуру и влажность. В рассматриваемый период метеорологи отмечают экстремальное количество осадков, особенно весной и осенью (2012, 2013, 2014, 2016 гг.), наряду с ростом среднегодовых температур, который в 2,5 раза превышает глобальный [26]. Недавние модельные исследования подтверждают значительное влияние среднемесячной температуры и влажности на популяцию клещей. Правда, в этой работе показано отрицательное влияние слишком высокой температуры и положительное влажности [27]. О снижении активности клещей в периоды продолжительных высоких температур воздуха и низкой влажности свидетельствуют и другие авторы [28]. Видимо, эти факторы значимы для жизнедеятельности клещей.

Соотношение исследованных видов клещей *D. reticulatus* / *I. ricinus* за весь период довольно близко в двух районах, находящихся в лесостепной зоне – 8,32%/91,68% в

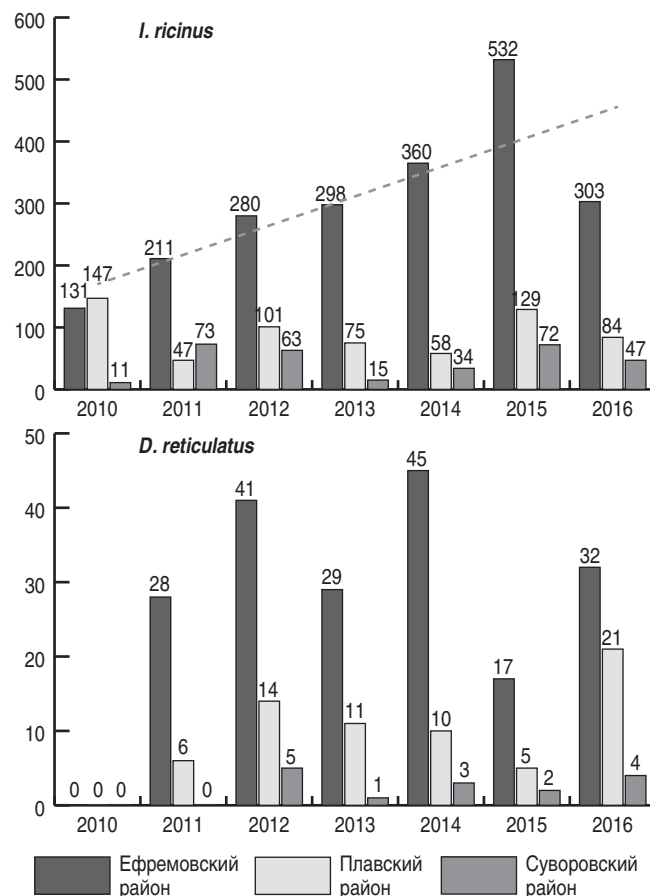


Рис. 2. Динамика числа укусов людей клещами в Тульской области. Ось ординат – количество укусов, ось абсцисс – годы. Пунктир – линия тренда.

Fig. 2. Dynamics of the number of tick bites in the Tula region. The ordinate axis is the number of bites, the abscissa axis is the years. Dotted line is the trend line.

Ефремовском районе и 12,0%/88,0% в Плавском. Для Суворовского района, находящегося в лесной зоне, это соотношение составляет 4,55%/95,45%. Скорее всего, это различие связано с особенностями биологии клеща *D. reticulatus*.

Из представленных данных следует, что ранжирование районов по числу зараженных клещей соответствует таковому по общему количеству клещей, снятых с людей. В клещах обнаружили следующие виды боррелий: *B. afzelii* (47,59% от общего числа зараженных клещей), *B. garinii* (37,93%), *B. valaisiana* (0,69%). В 13,79% случаев удалось типировать возбудителя только до рода. У одного клеща *D. reticulatus*, снятого с человека в Каменском районе, была обнаружена боррелия, вид которой определить не удалось. В экзemplяре *I. ricinus* из этого же района были обнаружены представители сразу двух видов боррелий – *B. afzelii* и *B. garinii*.

Снятых с укушенных людей клещей исследовали на наличие возбудителей боррелиоза. Результаты этих исследований представлены в таблице.

Сравнение доли инфицированных клещей по годам и трем районам представлено на рис. 3.

Судя по представленным данным, в Ефремовском районе не наблюдалось выраженной тенденции в доле инфицированных клещей, в то время как линии тренда для двух других районов показывают явное увеличение инфицированности клещей боррелиями с 2010 по 2016 г.

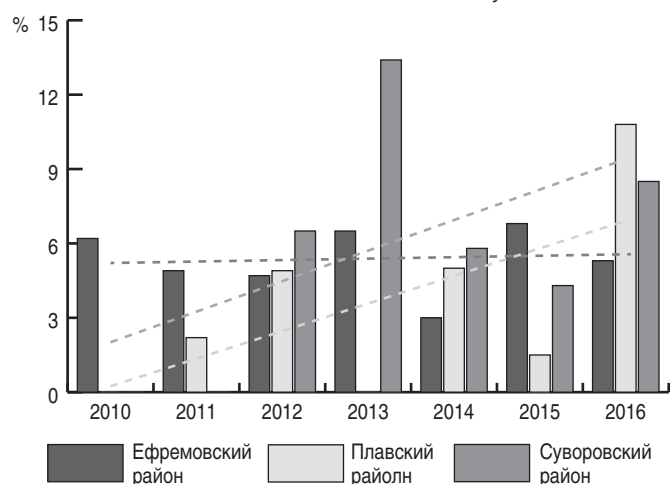


Рис. 3. Динамика доли инфицированных клещей *I. ricinus* в Тульской области. Ось ординат – % инфицированных клещей, ось абсцисс – годы. Пунктиром обозначены линии тренда.
Fig. 3. Dynamics of the proportion of infected *I. ricinus* ticks in the Tula region. The ordinate axis is % of infected ticks, the abscissa axis is the years. Dotted line is the trend line.

Спектр эпидемиологически значимых видов клещей и переносимых ими возбудителей инфекционных заболеваний существенно варьирует в зависимости от ландшафтов территории обитания. В частности, в соседней с Тульской Калужской области примерно с одинаковой частотой встречаются *D. reticulatus* и *I. ricinus* [29]. В Карелии это *I. persulcatus* и *I. ricinus*, причем первый вид встречается в подавляющем большинстве (95%). У клеща *I. persulcatus* выявлены вирус клещевого энцефалита (1,5%), *B. burgdorferi* sl. (32,5%), *Ehrlichia* sp. (3,3%). У *I. ricinus* последние встречаются реже (соответственно 16,3 и 0,8%) [30]. В Калининградской области у клещей *D. reticulatus* и *I. ricinus* обнаруживают ДНК риккетсий (встречаемость 2–10%) [31].

В Ростовской области отмечают ведущую роль клещей *D. marginatus* в циркуляции вируса клещевого энцефалита [32]. В Оренбуржье доминантными видами являются *D. marginatus* и *D. reticulatus* (соответственно 70,2 и 22,3% сборов) [8].

На основе полученных нами данных можно сделать следующие выводы:

- по полученным данным, наибольшее количество присасывания клещей отмечалось в двух районах Тульской области: Ефремовском (69,5%) и Плавском (15,5%);
- 92% пострадавших были укушены лесным клещом *I. ricinus*, 8% – луговым клещом *D. reticulatus*;
- исследование динамики числа укусов людей клещами выявило значительный рост укусов клещом в Ефремовском районе в период 2010–2016 гг. Предполагается, что это связано с климатическими изменениями (температура, влажность);
- в клещах *I. ricinus*, зараженных боррелиями, преобладали два геновида – *B. afzelii* и *B. garinii* (соответственно 47,59 и 37,93% от общего числа зараженных клещей);
- рост доли инфицированных клещей в исследуемый период выявлен в Плавском и Суворовском районах;
- ввиду роста обращений людей по поводу присасывания клещей, а также инфицированности клещей возбудителями ИКБ мониторинг численности клещей, выделение и идентификация находящихся в них возбудителей инфекционных заболеваний являются актуальными.

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.

Таблица. Данные об инфицированности клещей *I. ricinus* боррелиями
Table. Data of infection of *I. ricinus* ticks with borrelia

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	Итого по району / Total by district
Ефремовский район / Yefremovsky district								
<i>Borrelia afzelii</i>	5	4	4	6	4	15	8	108
<i>Borrelia garinii</i>	3	2	1	9	5	19	8	
<i>Borrelia valaisiana</i>				1				
<i>Borrelia</i> (вид не определен / indeterminate species)			8	3	2	1		
Плавский район / Plavsky district								
<i>Borrelia afzelii</i>			1		1	1	5	20
<i>Borrelia garinii</i>		1	1		1	1	4	
<i>Borrelia valaisiana</i>								
<i>Borrelia</i> (вид не определен / indeterminate species)			3		1			
Суворовский район / Suvorovsky district								
<i>Borrelia afzelii</i>		2	2	2	2	3	4	17
<i>Borrelia garinii</i>								
<i>Borrelia valaisiana</i>								
<i>Borrelia</i> (вид не определен / indeterminate species)			2					
ВСЕГО / Total	8	9	22	21	16	40	29	145

* Указано количество особей клещей, зараженных определенным видом боррелий.
* The number of of ticks infected with individual type of Borrelia is indicated.

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

- Korenberg EI, Gorban LY, Kovalevskii YV, Frizen VI, Karavanov AS. Risk for human tick-borne encephalitis, borrelioses, and double infection in the pre-Ural region of Russia. *Emerg Infect Dis*. 2001 May-Jun;7(3):459-62. DOI: 10.3201/eid0703.010319
- Письмо Роспотребнадзора от 27.03.2023 №02/4730-2023-32 «Об эпидемиологической ситуации по иксодовым клещевым боррелиозам в 2022 году и прогнозе на 2023 год».
- Бессолицына ЕА, Бердинских ИС, Столбова ФС, Дармов ИВ. Анализ зараженности бактериями рода *Borrelia* клещей на территории Кировской области. *Российский паразитологический журнал*. 2012;(4):41-46.
- Безбородов НГ, Половинкина НА, Попова СП. Клинические особенности локализованной стадии клещевого боррелиоза (болезни Лайма). *Земский врач*. 2013;3(20):32-35.
- Янковская ЯД, Чернобровкина ТЯ, Кошкин МИ. Современное состояние проблемы иксодовых клещевых боррелиозов. *Архив внутренней медицины*. 2015;(6):21-27.
- Козлова ТВ, Игнатюкова АС, Дорофеев ЭМ, Попов ВП, Орлов ДС. Распространение, численность и эпизоотологическое значение клеща *Dermacentor reticulatus* на территории Тульской области. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016;4:20-24.
- Козлова ТВ, Дорофеев ЭМ, Смольянинова ОЛ, Попов ВП. Распространение, численность и эпидемиологическое значение клеща *Ixodes ricinus* на территории Тульской области. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014;2:58-6.
- Христиановский ПИ, Белименко ВВ, Быстров ИВ. Фенология иксодовых клещей Оренбургской области. *Материалы IV Международного паразитологического симпозиума «Современные проблемы общей и частной паразитологии»*: материалы конференции, ответственный редактор Племяшов КВ. Санкт-Петербург: СПбГУВМ, 2022; 256-259.
- Василевич ФИ, Бегина АМ. Эпизоотологический мониторинг иксодовых клещей в Калужской области. *Ветеринария*. 2015;10.
- Hawryluk N, Zhiru L, Carlow C, Gokool S, Townson S, Kreiss T, et al. Filarial nematode phenotypic screening cascade to identify compounds with anti-parasitic activity for drug discovery optimization. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2022 Aug;19:89-97. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2022.06.002
- Лоренц НА, Околелов ВИ. Бабезиоз собак. Диагностика и современные методы лечения. *Актуальные вопросы ветеринарии*. 2020; 39-43.
- Янковская ЯД, Чернобровкина ТЯ, Онухова МП, Володина ВН, Бурова СВ, Никифоров ВВ, и др. Некоторые эпидемиологические аспекты инфекций, передающихся иксодовыми клещами, на территории мегаполиса. *Архив внутренней медицины*. 2017;7(6):423-432. DOI: 10.20514/2226-6704-2017-7-6-423-432
- Тарасенко ГН, Ворожко НВ, Курилова ЕА, Бекова АВ. Укус клеща: клинический случай из практики. *Российский журнал кожных и венерических болезней*. 2016;19(6):352-354. DOI: 10.18821/1560-9588-2016-19-6-352-354
- Зароченцев МВ, Таблер МВ, Воронцова ТВ, Сапунова НН, Иваницкий АВ, Веригина ЕВ, и др. Применение молекулярно-генетического метода в мониторинге за клещевым вирусным энцефалитом и боррелиозом. *Инфекция и иммунитет*. 2012;1-2:146.
- Полищук МВ, Зольник ТД. Эпидемиологические особенности иксодовых клещевых боррелиозов в регионах центра европейской части России. *Здоровье населения и среда обитания*. 2017;6(291):48-5.
- Василевич ФИ, Бегина АМ. Эпизоотологический мониторинг иксодовых клещей в Калужской области. *Ветеринария*. 2015; 10.
- Филиппова НА. Иксодовые клещи подсем. *Amblyommina*. Фауна России и сопредельных стран. Паукообразные. Наука. Ленинград. 1977; 4(5).
- Филиппова НА. Иксодовые клещи подсем. *Ixodidae*. Фауна СССР. Паукообразные. Наука. Ленинград. 1977; 4(4).
- Щит ИЮ, Решетняк ТВ, Баранова ЕВ, Нафеев АА, Колемагина ЕВ, Вовкотеч ПГ, и др. Мониторинг клещей – переносчиков возбудителей инфекций на территории Ульяновской области. *Бактериология*. 2021;6(1):16-24. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-1-16-24
- Янковская ЯД, Шашина НИ, Карань ЛС, Германт ОМ, Акимкин ВГ. Эпидемиологические и паразитологические аспекты и особенности профилактики инфекций, передающихся иксодовыми клещами, в Москве. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017;16(2):80-85. DOI: 10.31631/2073-3046-2017-16-2-80-85
- Коренберг ЭИ, Помелова ВП, Осин НС. Природно-очаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами. М., 2013.
- Козлова ТВ, Дорофеев ЭМ, Новохатка АД. Обогащение состава прокормителей личинок и нимф лесного европейского клеща на территории лесостепной зоны Тульской области. *Проблемы особо опасных инфекций на Северном Кавказе: материалы региональной научно-практической конференции с международным участием, посвященной 70-летию со дня основания ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора*. Ставрополь: Издательство ООО «Экспо-Медиа», 2022; 88-89.
- Инвазивные виды Карелии: Европейский лесной клещ [Электронный ресурс]. URL: <https://dias.krc.karelia.ru/species/22?ysclid=hlrc6hqu2662690747>
- Береснев ВВ, Ефимик ВЕ. Особенности экологии клещей *Dermacentor reticulatus* Fabricius, 1794 в Пермском крае. *Вестник Пермского университета. Сер. Биология*. 2022;3:204-211. DOI: 10.17072/1994-9952-2022-3-204-211
- Bilbija B, Spitzweg C, Papoušek I, Fritz U, Földvári G, Mullett M, et al. *Dermacentor reticulatus* – a tick on its way from glacial refugia to a panmictic Eurasian population. *Int J Parasitol*. 2023 Feb;53(2):91-101. DOI: 10.1016/j.ijpara.2022.11.002
- Доклад об особенностях климата на территории Российской Федерации за 2016 год. М., 2017.
- Василевич ФИ, Никанорова АМ. Математическое моделирование эктопаразитов-кровососов Нечерноземья РФ. *Материалы IV Международного паразитологического симпозиума «Современные проблемы общей и частной паразитологии»*: материалы конференции, ответственный редактор Племяшов КВ. Санкт-Петербург: СПбГУВМ, 2022; 46-49.
- Сарапульцева ЕС, Стариков ВП, Володина ОЮ. Иксодовые клещи красной полевки (*Myodes rutilus*) таежной и степной зон Южного Зауралья. *Материалы IV Международного паразитологического симпозиума «Современные проблемы общей и частной паразитологии»*: материалы конференции, ответственный редактор Племяшов КВ. Санкт-Петербург: СПбГУВМ, 2022; 214-217.
- Василевич ФИ, Никанорова АМ. Фауно-экологические особенности паразитирования иксодовых клещей Центральной части Восточно-Европейской равнины. *Российский паразитологический журнал*. 2020;14(3):11-17.
- Бугмырин СВ, Беспятова ЛА, Кочерова НА, и др. Иксодовые клещи и переносимые ими инфекции по данным обрабатываемости населения в Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Карелия. *Материалы IV Международного паразитологического симпозиума «Современные проблемы общей и частной паразитологии»*: материалы конференции, ответственный редактор Племяшов КВ. Санкт-Петербург: СПбГУВМ, 2022; 42-43.
- Волчев ЕГ, Зотов СИ, Карташов МЮ, др. Иксодовые клещи (*Acari: Ixodidae*) в антропогенезированных ландшафтах Калининградской области и детекция в них риккетсий. *Материалы IV Международного паразитологического симпозиума «Современные проблемы общей и частной паразитологии»*: материала-

лы конференции, ответственный редактор Племяшов КВ. Санкт-Петербург: СПбГУВМ, 2022; 49-51.

32. Гювен ЭЭ, Степанян НС, Севрюков АВ. О значение клещей рода *Dermacentor* в природных очагах клещевого энцефалита Ростовской области. Материалы IV Международного паразитологического симпозиума «Современные проблемы общей и частной паразитологии»: материалы конференции, ответственный редактор Племяшов КВ. Санкт-Петербург: СПбГУВМ, 2022; 56-58.

References

1. Korenberg EI, Gorban LY, Kovalevskii YV, Frizen VI, Karavanov AS. Risk for human tick-borne encephalitis, borrelioses, and double infection in the pre-Ural region of Russia. *Emerg Infect Dis*. 2001 May-Jun;7(3):459-62. DOI: 10.3201/eid0703.010319
2. Pis'mo Rospotrebnadzora ot 27.03.2023 №02/4730-2023-32 «Ob epidemiologicheskoi situatsii po iksodovym kleshchevym borreliozam v 2022 godu i prognoze na 2023 god». (In Russian).
3. Bessolitsyna EA, Berdinskih IS, Stolbova FS, Darmov IV. The analysis of contamination by bacteria of genus *Borrelia* ticks in Kirov area. *Russian Journal of Parasitology*. 2012;4:41-46. (In Russian).
4. Bezborodov NG, Polovinkina NA, Popova SP. Clinical features of localized tick-borne borreliosis (lyme disease). *Zemskii vrach*. 2013;3(20):32-35. (In Russian).
5. Yankovskaya YaD, Chernobrovkina TYa, Koshkin MI. Status update on the problem of ixodic lyme disease. *The Russian Archives of Internal Medicine*. 2015;6:21-27. (In Russian).
6. Kozlova TV, Ignat'kova AS, Dorofeev EM, Popov VP, Orlov DS. Dissemination, abundance rates and epizootiological significance of the tick *Dermacentor reticulatus* in the territory of the Tula region. *Problemy osobo opasnykh infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections)*. 2016;4:20-24. (In Russian).
7. Kozlova TV, Dorofeev EM, Smol'yaninova OL, Popov VP. Distribution, Abundance, and Epidemiological Significance of Ixodes ricinus Ticks in the Territory of the Tula Region. *Problemy osobo opasnykh infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections)*. 2014;(2):58-6. (In Russian).
8. Khristianovsky PI, Belimenko VV, Byistrov IV. Phenology of hard ticks in Orenburg region. *Materiialy IV Mezhdunarodnogo parazitologicheskogo simpoziuma «Sovremennye problemy obshchei i chastnoi parazitologii»*: materialy konferentsii, otvetstvennyi redaktor Plemyashov KV. Saint-Petersburg: SPbGUV, 2022;256-259. (In Russian).
9. Vasilevich FI, Beginina AM. Epizootologic monitoring of ixodes ticks in the Kaluga region. *Veterinary Medicine*. 2015. (In Russian).
10. Hawryluk N, Zhiru L, Carlow C, Gokool S, Townson S, Kreiss T, et al. Filarial nematode phenotypic screening cascade to identify compounds with anti-parasitic activity for drug discovery optimization. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2022 Aug;19:89-97. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2022.06.002
11. Babesiosis of dogs. Diagnostics and modern methods of treatment. Lorenz NA, Okolelov VI. *Actual Question in Veterinary Biology*. 2020; 39-43. (In Russian).
12. Yankovskaya YaD, Chernobrovkina TYa, Onuhova MP, Volodina VN, Burova SV, Nikiforov VV. Some epidemiological aspects associated with infections transmitted by ixodid ticks in metropolitan city. *Archive of Internal Medicine*. 2017;7(6):423-432. DOI: 10.20514/2226-6704-2017-7-6-423-432 (In Russian).
13. Tarasenko GN, Vorozhko NV, Kurilova EA, Bekoeva AV. Tick bite: clinical case report. *Russian Journal of Skin and Venereal Diseases (Rossiyskii zhurnal kozhnykh i venericheskikh boleznei)*. 2016;19(6):352-354. DOI: 10.18821/1560-9588-2016-19-6-352-354 (In Russian).
14. Zarochentsev MV, Tabler MV, Vorontsova TV, Sapunova NN, Ivanitsky AV, Verigina EV, et al. Primenenie molekulyarno-geneticheskogo metoda v monitoringe za kleshchevym virusnym entsefalitom i borreliozom. *Infektsiya i immunitet (Russian Journal of Infection and Immunity)*. 2012;1-2:146. (In Russian).
15. Polishchuk MV, Zdol'nik TD. Epidemiological features of ixodes tickborne borrelioses in the regions of the center of the european part of Russia. *The Russian Journal Public Health and Life Environment*. 2017;6(291):48-5. (In Russian).
16. Vasilevich FI, Beginina AM. Epizootologic monitoring of ixodes ticks in the Kaluga region. *Veterinary medicine*. 2015; 10. (In Russian).
17. Filippova NA. Iksodovye kleshchi podsem. Amblyommina. Fauna Rossii i sopredel'nykh stran. Paukoobraznye. Nauka. Leningrad. 1977; 4(5). (In Russian).
18. Filippova NA. Iksodovye kleshchi podsem. Ixodidae. Fauna SSSR. Paukoobraznye. Nauka. Leningrad. 1977; 4(4). (In Russian).
19. Shchit'Yu, Reshetnyak TV, Baranova EV, Nafeev AA, Kolemagina EV, Vovkotech PG. Monitoring of pathogens-carrying ticks on the territory of the Ulyanovsk region. *The bacteriology*. 2021;6(1):16-24. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-1-16-24 (In Russian).
20. Yankovskaya YD, Shashina NI, Karan LS, Germant OM, Akimkin VG. Epidemiological and Parasitological Aspects and Peculiarity Prevention of Infections Transmitted by Ixodid Ticks in Moscow. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2017;16(2):80-85. DOI: 10.31631/2073-3046-2017-16-2-80-85 (In Russian).
21. Korenberg E, Pomelova V, Osin N. Infections with Natural Focality transmitted by ixodid ticks. Moscow. 2013 (In Russian).
22. Kozlova TV, Dorofeev EM, Novokhatka AD. Obogashchenie sostava prokormitelei lichinok i nimf lesnogo evropeiskogo kleshcha na territorii lesostepnoi zony Tul'skoi oblasti. *Problemy osobo opasnykh infektsii na Severnom Kavkaze materialy regional'noi nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem, posvyashchennoi 70-letiyu so dnya osnovaniya FKUZ Stavropol'skii protivochumnyi institut Rospotrebnadzora. Stavropol': Izdatel'stvo OOO "Ekspo-Media", 2022; 88-89. (In Russian).*
23. Invazivnye vidy Karelii: Evropeiskii lesnoi kleshch [Elektronnyi resurs]. URL: <https://dias.krc.karelia.ru/species/22?ysclid=ihrc6hqu2662690747> (In Russian).
24. Beresnev VV, Efimik VE. Features of the ecology of ticks *Dermacentor reticulatus Fabricius*, 1794 in Perm Krai. *Bulletin of the Perm University. Biology*. 2022;3:204-211. DOI: 10.17072/1994-9952-2022-3-204-211 (In Russian).
25. Bilbija B, Spitzweg C, Papoušek I, Fritz U, Földvári G, Mullett M, et al. *Dermacentor reticulatus* – a tick on its way from glacial refugia to a panmictic Eurasian population. *Int J Parasitol*. 2023 Feb;53(2):91-101. DOI: 10.1016/j.ijpara.2022.11.002
26. Doklad ob osobennostyakh klimata na territorii Rossiiskoi Federatsii za 2016 god. M., 2017. (In Russian).
27. Vasilevich FI, Nikanorova AM. Matematicheskoe modelirovanie ektoparazitov-krovososov Nechernozem'ya RF. *Materiialy IV Mezhdunarodnogo parazitologicheskogo simpoziuma «Sovremennye problemy obshchei i chastnoi parazitologii»*: materialy konferentsii, otvetstvennyi redaktor Plemyashov KV. Saint-Petersburg: SPbGUV, 2022; 46-49. (In Russian).
28. Sarapul'tseva ES, Starikov VP, Volodina OYu. Iksodovye kleshchi krasnoi polevki (*Myodes rutilus*) taezhnoi i stepnoi zon Yuzhnogo Zaural'ya. *Materiialy IV Mezhdunarodnogo parazitologicheskogo simpoziuma «Sovremennye problemy obshchei i chastnoi parazitologii»*: materialy konferentsii, otvetstvennyi redaktor Plemyashov KV. Saint-Petersburg: SPbGUV, 2022; 214-217. (In Russian).
29. Vasilevich FI, Nikanorova AM. Features of Fauna and Ecology of Ixodid Ticks Parasitizing in the Central Part of the East European Plain. *Rossiyskiy parazitologicheskii zhurnal (Russian Journal of Parasitology)*. 2020;14(3):11-17. DOI: 10.31016/1998-8435-2020-14-3-11-17 (In Russian).
30. Bugmyrin SV, Bespyatova LA, Kocherova NA, et al. Iksodovye kleshchi i perenosimye imi infektsii po dannym obrashchaemosti naseleniya v Tsentri gigieny i epidemiologii v Respublike Kareliya. *Materiialy IV Mezhdunarodnogo parazitologicheskogo simpoziuma «Sovremennye problemy obshchei i chastnoi parazitologii»*: materialy konferentsii, otvetstvennyi redaktor Plemyashov KV. Saint-Petersburg: SPbGUV, 2022; 42-43. (In Russian).
31. Volchev EG, Zotov SI, Kartashov MYu, et al. Iksodovye kleshchi (*Acari: Ixodidae*) v antropogenezirovannykh landshaftakh Kaliningradskoi oblasti i detektsiya v nikh

rikketsii. Materialy IV Mezhdunarodnogo parazitologicheskogo simpoziuma «Sovremennye problemy obshchei i chastnoi parazitologii»: materialy konferentsii, otvetstvennyi redaktor Plemiyashov KV. Saint-Petersburg: SPbGUVU, 2022; 49-51 (In Russian).

32. Gyuvon EE, Stepanyan NS, Sevyukov AV. O znachenie kleshchei roda Dermacentor v prirodnykh ochagakh kleshchevogo entsefalita Rostovskoi oblasti. Materialy IV Mezhdunarodnogo parazitologicheskogo simpoziuma «Sovremennye problemy obshchei i chastnoi parazitologii»: materialy konferentsii, otvetstvennyi redaktor Plemiyashov KV. Saint-Petersburg: SPbGUVU, 2022; 56-58. (In Russian).

Информация о соавторах:

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

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

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

Фольмер Анастасия Владимировна, инженер отдела информационных технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Козлова Татьяна Викторовна, энтомолог лаборатории природно-очаговых и особо опасных инфекций ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Тульской области»

Information about co-authors:

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

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

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

Anastasia V. Folmer, Engineer, Information Technology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Tatyana V. Kozlova, Entomologist of the Laboratory of Natural Focal and Especially Dangerous Infections, Center for Hygiene and Epidemiology in the Tula Region

НОВОСТИ НАУКИ

Патогенетические особенности антибиотик-ассоциированного синдрома на примере биологической модели

Антибактериальная терапия – неотъемлемая часть современной терапевтической практики, позволяющая спасать жизни пациентов. Однако, как и при любом терапевтическом вмешательстве, возможно развитие побочных эффектов, одним из которых является антибиотик-ассоциированный синдром (ААС).

Цель. Изучение патогенетических особенностей экстраинтестинальных проявлений ААС на примере биологической модели.

Материалы и методы. В 2019–2020 гг. на базе ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора было проведено исследование на примере биологической модели (беспородные мыши-самцы). Подопытным животным вводились антибактериальные препараты амоксициллин с клавулановой кислотой и цефотаксим в двух дозах – средней и максимальной терапевтических. Перерасчет дозы лекарственных средств осуществлялся в зависимости от массы тела животного. Сравнение проводилось в 4 исследовательских группах и одной контрольной, распределение по которым осуществлялось в зависимости от дозы и вида антибактериального препарата. В ходе работы оценивали результаты гистологических исследований внутренних органов (толстая кишка, тонкая кишка, печень, поджелудочная железа, почка, легкое, сердце, тестикулы, селезенка, желудок, двенадцатиперстная кишка, кожа, мочевого пузыря) в двух временных точках: первая – спустя 24 ч от момента введения лекарственных средств, вторая – спустя 7 суток после окончания курса антибактериальной терапии.

Результаты. Результаты гистологического исследования в первой контрольной временной точке (спустя 24 ч от начала введения лекарственных средств) демонстрируют, что применение исследуемых антибактериальных средств в средней терапевтической дозе не вызвало значимых морфологических изменений в исследуемых органах, в то время как введение максимальной дозы лекарственного средства привело к развитию реактивных изменений, в первую очередь со стороны сосудистой системы. Результаты гистологического исследования в опытных группах во второй контрольной временной точке (спустя 7 суток после окончания курса антибактериальной терапии) демонстрируют системную реакцию со стороны исследуемых органов, выражающуюся преимущественно в периваскулярной лейкоцитарной инфильтрации. Аналогичные изменения регистрируются и в группе подопытных животных, которым вводились средние терапевтические дозы антибактериальных лекарственных средств.

Заключение. ААС характеризуется системностью и однотипностью патоморфологических изменений в различных тканях, что объясняет не только развитие антибиотик-ассоциированной диареи, но и его внекишечные симптомы. Полученные нами данные позволяют выдвинуть гипотезу о том, что антибиотики, особенно при нерациональном их применении, на популяционном уровне повышают риски развития патологии, связанной с системной воспалительной реакцией, в частности атеросклероза и ожирения.

Плоскирева А.А., Горелов А.В., Голден Л., Николаева С.В., Симкова Е.Ю.

Патогенетические особенности антибиотик-ассоциированного синдрома на примере биологической модели.

Инфекционные болезни. 2022; 20(3): 42–49. DOI: 10.20953/1729-9225-2022-3-42-49

Источник: <https://www.phdynasty.ru>

Совершенствование сублимационной сушки холерных диагностических сывороток в ампулах

А.В.Комиссаров¹, С.А.Бадарин¹, Д.Н.Бибииков¹, Н.В.Синицына¹, Н.И.Костылева¹, Е.А.Глазкова¹,
А.С.Феськова¹, М.В.Овчинникова¹, А.К.Никифоров^{1,2}

¹ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Российская Федерация;

²Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И.Вавилова, Саратов, Российская Федерация

В доступной литературе отсутствуют сведения по разработке технологии сублимационной сушки холерных диагностических сывороток в ампулах. В связи с этим исследование процесса лиофилизации данных препаратов для обоснования оптимальных параметров процесса является актуальной научно-практической задачей.

Цель работы. Исследование процесса сублимационной сушки холерных диагностических сывороток в ампулах для обоснования оптимальных параметров процесса.

Материалы и методы. Лيوфилизацию холерных диагностических сывороток проводили на установке Martin Christ Epsilon 2-6D. Остаточную влажность сухих сывороток определяли с использованием влагомера Sartorius MA 150. Для нахождения базовой модели и расчетной зависимости потери массы при высушивании от технологических параметров лиофилизации использовали полный факторный эксперимент 2ⁿ.

Результаты. Установлено, что этап сублимации описывается линейным повышением температуры препарата, при этом резкий скачок увеличения температуры свидетельствует об окончании первичной сушки. Определены температуры полного заморозания, нижней и верхней эвтектической температуры холерных диагностических сывороток. Выявлено, что при протекании процесса в ампулах имеется значительная гетерогенность подвода энергии по площади кюветы, при этом первичная сушка в крайних ампулах происходит интенсивнее, чем в тех, которые находятся ближе к центру кюветы. Установлено, что с увеличением высоты материала в первичной упаковке при одном и том же его количестве возрастает время лиофилизации препаратов. Выявлено, что на продолжительность лиофилизации препарата значительное воздействие производит уровень наполнения плит и плотность расположения ампул. Разработана прогностическая модель определения времени десорбции для установления требуемого значения потери массы при высушивании.

Заключение. Обоснованные нами приемы установления рационального режима лиофилизации холерных диагностических сывороток используются при производстве данных препаратов.

Ключевые слова: холерные диагностические сыворотки, лиофилизация, ампулы, исследование

Для цитирования: Комиссаров А.В., Бадарин С.А., Бибииков Д.Н., Синицына Н.В., Костылева Н.И., Глазкова Е.А., Феськова А.С., Овчинникова М.В., Никифоров А.К. Совершенствование сублимационной сушки холерных диагностических сывороток в ампулах. Бактериология. 2023; 8(2): 34–41. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-34-41

Improvement freeze-drying of diagnostic cholera sera in ampoules

A.V.Komissarov¹, S.A.Badarin¹, D.N.Bibikov¹, N.V.Sinitsyna¹, N.I.Kostyleva¹, E.A.Glazkova¹,
A.S.Fes'kova¹, M.V.Ovchinnikova¹, A.K.Nikiforov^{1,2}

¹Russian Anti-Plague Institute «Microbe» of the Rosпотребнадзор, Saratov, Russian Federation;

²N.I.Vavilov Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering, Saratov, Russian Federation

There is no information in the available literature on the development of freeze-drying technology for cholera diagnostic serums in ampoules. In this regard, the study of the lyophilization process of these drugs to substantiate the optimal parameters of the process is an urgent scientific and practical task.

Purpose of the work. Was a study of freeze-drying of diagnostic cholera sera in ampoules to substantiate the optimum process parameters.

Для корреспонденции:

Комиссаров Александр Владимирович, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник ФКУН «Российский противочумный «Микроб» Роспотребнадзора

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (917) 2132-402
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Статья поступила 28.04.2023, принята к печати 30.06.2023

For correspondence:

Alexander V. Komissarov, PhD, DSc (Biological Sciences), Professor, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rosпотребнадзор

Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (917) 2132-402
E-mail: rusrapi@microbe.ru

The article was received 28.04.2023, accepted for publication 30.06.2023

Materials and methods. Cholera diagnostic sera. Lyophilization was carried out on a Martin Christ Epsilon 2-6D unit. The residual moisture content in dried sera was determined using a Sartorius MA 150 hydrometer. A full factorial experiment 2ⁿ was used to find the baseline model and the calculated dependence of weight loss on drying on lyophilization process parameters.

Results. It has been established that the sublimation stage is characterized by a linear increase in the temperature of the preparation, while a sharp temperature rise indicates the end of primary drying. The temperatures of complete freezing, lower and upper eutectic temperatures of cholera diagnostic sera have been determined. It has been found that when the process flows in ampoules, there is a significant heterogeneity of energy supply across the cuvette: the primary drying in the outermost ampoules occurs more intensively than in those that are closer to the center of the cuvette. It has been established that with an increase in the height of the material in the primary packaging at the same amount of it, the time of lyophilization of preparations increases. It is revealed that the duration of the lyophilization of the drug is significantly affected by the filling level of the plates and the proximity of the ampoules. A predictive model for determining the desorption time to establish the required value of weight loss during drying has been developed.

Conclusions. The methods we have substantiated for establishing a rational lyophilization regime for cholera diagnostic serums are used in the production of these drugs.

Key words: cholera diagnostic sera, lyophilization, ampoules, research

For citation: Komissarov A.V., Badarin S.A., Bibikov D.N., Sinitsyna N.V., Kostyleva N.I., Glazkova E.A., Fes'kova A.S., Ovchinnikova M.V., Nikiforov A.K. Improvement freeze-drying of diagnostic cholera sera in ampoules. Bacteriology. 2023; 8(2): 34–41. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-34-41

Ф КУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора для идентификации *Vibrio cholerae* производит 5 наименований диагностических холерных сывороток. Эти препараты выпускаются в ампулах в виде лиофилизата. Методические приемы производства данных препаратов в форме лиофилизата разработаны в 1950-х гг. Однако нам не удалось найти в доступной литературе сведения о разработке технологии их сублимационной сушки. В связи с этим исследование процесса лиофилизации холерных диагностических сывороток в ампулах для обоснования оптимальных параметров процесса является актуальной научно-практической задачей.

Материалы и методы

Ллиофилизация образцов препаратов проводилась на лиофилизационной машине Epsilon 2-6D (Martin Christ, Германия). Потерю массы при высушивании находили с помощью инфракрасного термогравиметрического анализатора влажности MA 150 (Sartorius, Германия).

Для нахождения базовой модели и расчетной зависимости потери массы при высушивании (ПМВ) от технологических параметров лиофилизации использовали полный факторный эксперимент (ПФЭ) 2ⁿ [1]. Методика постановки и реализации подробно изложена в наших исследованиях по разработке расчетных зависимостей для оценки ПМВ при лиофилизации модельных растворов диагностических бактериофагов [2].

Результаты и обсуждение

Специфика лиофилизации препарата в единичной ампуле

Традиционно процесс сублимационного высушивания (лиофилизации) дифференцируют по трем ключевым этапам: замораживание, сублимация (первичное высушивание) и десорбция (вторичное высушивание) [3–6]. Ллиофилизация препаратов состоит из совокупности персональных процессов, происходящих в комплексе отдельных ампул. Возможность контроля уменьшения веса всех ампул при проведении сушки отсутствует. Соответственно нереально представить динамику индивидуального процесса лиофилизации каждой ампу-

лы. В связи с этим существует потребность создания методики управления процессом сублимационного высушивания. Нами предпринята попытка обоснования опытным путем способа определения завершения первичной сушки на основе анализа кривых, отражающих изменение температуры препарата во времени при его лиофилизации.

В начале процесса обсуждения результатов исследований следует сказать о том, что численные значения полученных результатов отличались для разных наименований холерных диагностических сывороток в пределах от 2 до 5%. Практически полное совпадение полученных данных объясняется одинаковой технологией их производства. В связи с этим в дальнейшем мы будем говорить обобщенно по всем сывороткам.

На рис. 1 изображена кривая, отражающая изменение температуры холерной диагностической сыворотки во времени при ее лиофилизации в одиночной ампуле ШП-5 на полке лиофилизатора. Количество препарата составляло 1,1 мл. Заморозка производилась на полке лиофилизатора до минус 45°C. Ллиофилизация осуществлялась при остаточном давлении 0,1–0,15 мбар. Анализ данных, представленный на рис. 1, позволяет констатировать следующее.

После включения вакуумного насоса за 0,5 ч в сушилке устанавливается заданное значение вакуума. Визуально на конденсаторе лиофилизатора в этот момент наблюдается легкий налет льда, что свидетельствует об удалении замороженной влаги, имеющейся на конструкциях продуктового

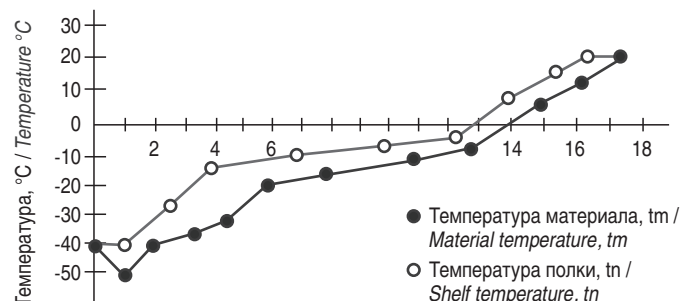


Рис. 1. Кривая отражающая изменение температуры холерной диагностической сыворотки во времени при ее лиофилизации в одиночной ампуле ШП-5.

Fig. 1. The curve expressing the change in the temperature of cholera diagnostic serum over time during its lyophilization in a single ampoule 5 ml.

отсека, и начале процесса первичного высушивания препарата. При этом происходит дополнительное охлаждение материала до -50°C . После процесс лиофилизации выходит на стационарный уровень, который, собственно, обозначается как этап сублимации. На кривой, отражающей изменение температуры холерной диагностической сыворотки во времени при ее лиофилизации, он описывается линейным повышением температуры препарата от -50°C до -38°C . Спустя 4,5 ч от начала процесса фиксируется скачок температуры в $5\text{--}10^{\circ}$ (в области точки А на рис. 1), после чего наблюдается выравнивание температур препарата и плит. Данный этап лиофилизации принято обозначать вторичным высушиванием. При десорбции уже отсутствует «несвязанная» влага и протекает извлечение из материала «связанной». Лيوфилизация заканчивается в момент достижения препаратом температуры полки сушильной установки t_m , нагреваемой, как правило, до комнатной температуры.

Представляет интерес довольно интенсивное увеличение температуры в области точки А через 4,5 ч от начала сушки за сравнительно небольшой период времени (40–50 мин). Зрительно выявлено, что данный перегиб совпадает с достижением высушенного материала дна ампулы, что может свидетельствовать об окончании сублимации. Последующее определение потери массы при высушивании в препарате, извлеченном из сушильной установки, показало, что данная величина составляет $12 \pm 1\%$. Принимая во внимание, что количество «несвязанной» влаги в замороженных препаратах, по данным литературы [7–9], составляет 80–90%, с большой долей вероятности можно утверждать об окончании этапа первичного высушивания.

Определение температуры полного замерзания, нижней и верхней эвтектической температуры холерных диагностических сывороток

Процесс сублимационной сушки материалов начинается с заморозки. Определяющими параметрами, дающими возможность установить оптимальные характеристики этапов

заморозки и дальнейшей сушки, служат температура полного отвердевания, нижняя и верхняя эвтектическая температуры [8, 10, 11]. Для определения этих параметров применяли методику, разработанную L.Reu [12]. При реализации данной методики проводят одновременное определение температуры исследуемого вещества и электрического сопротивления в течение заморозки с последующим размораживанием материала. Данные процедуры проводили на лиофилизационной машине Epsilon 2-6D. На этой установке измеряемое датчиком электрическое сопротивление выводится на дисплей в процентах. Данная методика была успешно применена нами при исследовании теплофизических характеристик иммуногенов холерной химической вакцины [13].

На рис. 2 показана кривая, выражающая взаимосвязь электрического сопротивления и температуры исследуемых образцов, изучение которой позволяет определить значения температуры полного отвердевания (-40°C , точка А), нижней (-35°C , точка В) и верхней (-25°C , точка С) эвтектической температуры.

На основании полученных данных и заключений, представленных в работах, посвященных исследованию процессов лиофилизации [11, 14], можно утверждать о желательности заморозки холерных диагностических сывороток до $-40\text{--}-45^{\circ}\text{C}$ (на $5\text{--}10^{\circ}\text{C}$ меньше величины нижней эвтектической температуры) и сублимации препаратов при температуре $-25\text{--}-35^{\circ}\text{C}$.

С целью подтверждения возможности проведения сублимации в найденных интервалах эвтектических температур были проведены сушки при температурах препарата -30°C (интервал между верхней и нижней эвтектическими температурами) и -20°C . В первом случае после окончания полного цикла лиофилизации сухой материал имел вид хорошо сформированной однородной таблетки. Во втором случае таблетка была неоднородной, с хорошо сформированной структурой в верхней части, а нижняя часть была деформированной. При этом таблетка не прилегала к дну ампулы, как в первом случае. Это свидетельствует о том, что во время сублимации произошло частичное оттаивание препарата и «подскок» таблетки.

Характер подвода тепла при лиофилизации препаратов в ампулах

Ранее было выявлено, что для одиночной ампулы допускается определять завершение первичной сушки по резкому увеличению температуры на кривой изменения температуры сыворотки во времени. Представляло определенный научно-практический интерес исследование динамики первичной сушки в различных местах кюветы с ампулами. Размер кюветы составлял 225×300 мм (ширина \times глубина), всего в нее при полной загрузке помещалось 300 ампул. Датчики температуры были помещены в ампулы с препаратом в соответствии со схемами, показанными на рис. 3. Было проведено по 3 цикла сушки, протекающей в соответствии с установленными в технологической документации параметрами (вакуум – 0,1–0,15 мбар; профиль нагрева плиты – нагрев от -40°C до 20°C с шагом $10^{\circ}\text{C}/\text{ч}$, выдерживание при данной температуре до достижения продуктом температуры 20°C , нагрев до 25°C и выдерживание при ней в течение 6 ч).

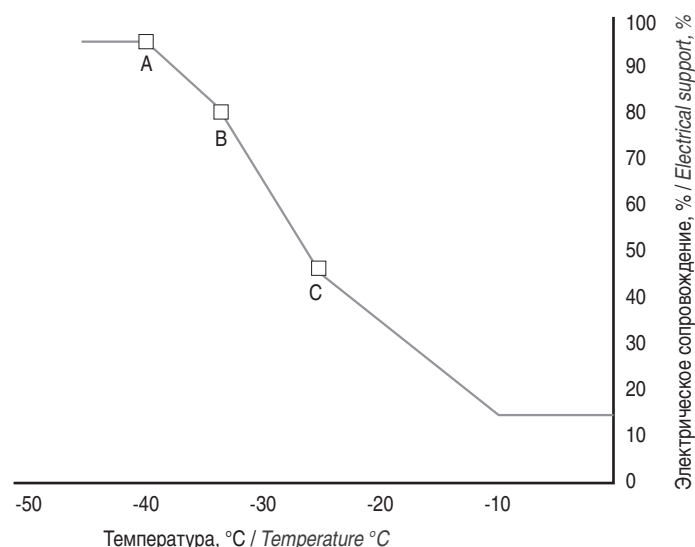


Рис. 2. Кривая, выражающая взаимосвязь электрического сопротивления и температуры холерной диагностической сыворотки.

Fig. 2. The curve expressing the relation between electrical resistance and temperature of cholera diagnostic serum.

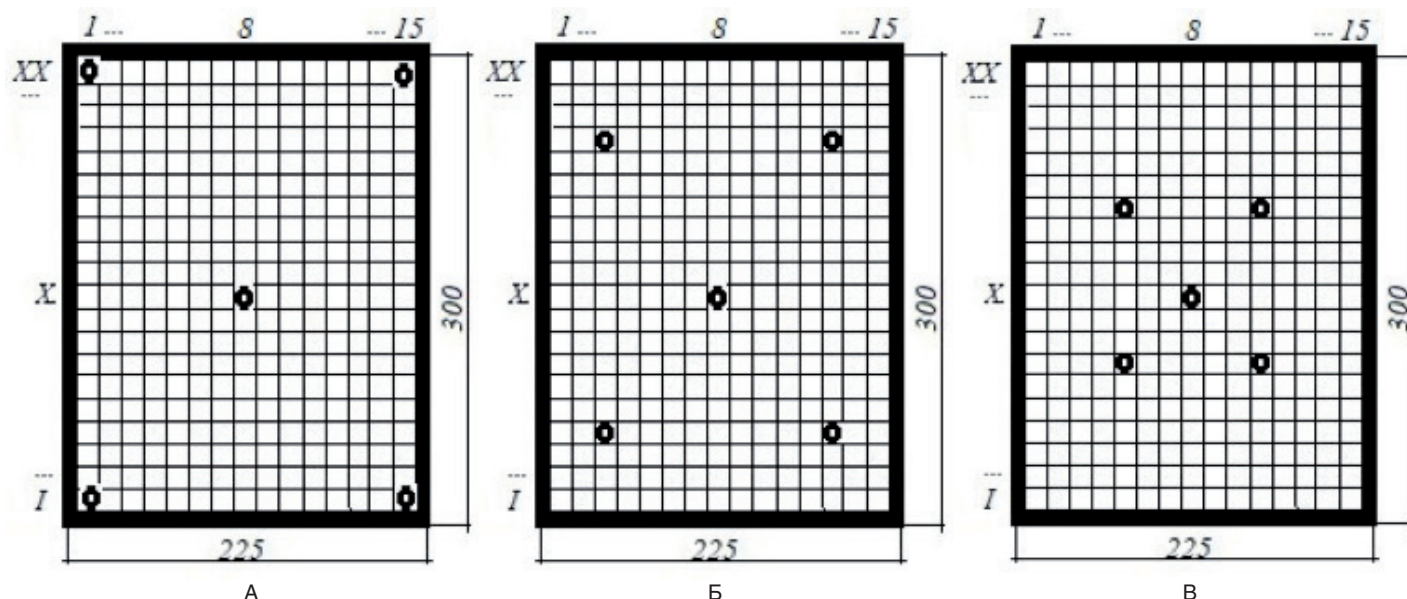


Рис. 3. Схема расположения датчиков температуры.
Fig. 3. Scheme of temperature sensors.

В табл. 1 представлены данные эксперимента по определению времени начала резкого увеличения температуры на кривой, отражающей изменение температуры холерной диагностической сыворотки.

Полученные данные свидетельствуют о том, что интенсивность первичной сушки в периферийных ампулах протекает интенсивнее, чем в тех, которые находятся ближе к центру кюветы. Данный феномен объясняется, на наш взгляд, неоднородностью подвода тепла по площади охлажда-

ющей плиты. Площадь соприкосновения стандартных цилиндрических ампул мала, поэтому интенсивность переноса тепла между ампулами незначительна. Между тем при повышении температуры плиты периферийные ампулы приобретают больше энергии из-за неуправляемого подвода тепла от конструкций продуктового отсека путем радиации и конвекции. Ампулы воспринимают эту теплоту всей площадью, поверхность которой на порядок больше высушиваемого продукта. Дополнительная энергия, приобретенная периферийными ампулами, полностью расходуется на первичную сушку продукта в них самих и не распространяется на ампулы, расположенные ближе к центру, вследствие сильного сопротивления передачи. Следовательно, продукт в крайних ампулах кюветы находится в положении, более благоприятном для сублимации, с более низкой температурой полки высыхает значительно раньше.

Эти результаты убедительно говорят о целесообразности управления процессом по температуре материала в ампулах, расположенных в центральной части кюветы, где возможность повреждения продукта гораздо больше.

Лиофилизация препаратов при различных геометрических характеристиках первичной упаковки

Представляло интерес сравнительное исследование кинетики лиофилизации препаратов в ампулах и флаконах. Материал разливался по 1,1 мл во флаконы ФО-10 вместимостью 10 мл. Высота слоя материала составляла 3 мм (при получении материала в ампуле ШП-5 она была 6 мм). Кроме того, флаконы ФО-10 и ампулы ШП-5 различаются по геометрическим характеристикам. Было проведено по 3 цикла сушки препаратов в ампулах и флаконах при полной загрузке сублимационной установки, протекающих в соответствии с установленным в технологической документации параметрами (вакуум – 0,1–0,15 мбар; профиль нагрева плиты – нагрев от -4°C до 20°C с шагом 10°C/ч, выдерживание при данной температуре до достижения продуктом температуры

Табл. 1. Данные проведенного эксперимента по определению времени начала резкого увеличения температуры
Table. 1. Data from the experiment to determine the time of the onset of the sharp increasing of temperature

Схема расположения датчиков температуры (рис. 3) / Scheme of temperature sensors (Fig. 3)	Место расположения точек контроля температуры / Location of temperature control points	Время начала резкого увеличения температуры, ч / Time of onset of the sharp increasing of temperature, h
Схема а Scheme a	I-1	6
	XX-1	6
	X-8	12
	XX-15	6
	I-15	6
Схема б Scheme b	III-3	8
	XVII-3	8
	X-8	12
	XVII-13	8
	III-13	8
Схема в Scheme v	VII-5	10
	XIV-5	10
	X-8	12
	XIV-11	10
	VII-11	10

Табл. 2. Результаты экспериментов по лиофилизации продукта при разном числе ампул, помещенных на плиты лиофилизатора
Table. 2. Results of experiments on lyophilization of the product with different number of ampoules placed on the lyophilizer plates

Варианты эксперимента / <i>Variants of the experiment</i>						Время процесса, ч* / <i>Process time, h*</i>	
Вариант I (одна плита) / <i>Option I (one plate)</i>							
Площадь плиты с продуктом, % / <i>Area of the plate with the product, %</i>			Количество ампул, шт. / <i>Number of ampoules, pcs.</i>				
20			60				12
40			120				15
60			180				18
80			240				21
100			300				24
Вариант II (2 плиты) / <i>Option II (two plates)</i>							
Площадь плиты I с продуктом, % / <i>Plate area I with product, %</i>	Количество ампул / <i>Number of ampoules</i>	Время процесса, ч / <i>Process time, h*</i>	Площадь плиты II с продуктом, % / <i>Plate area II with product, %</i>	Количество ампул / <i>Number of ampoules</i>	Всего ампул / <i>Total ampoules</i>	Время процесса, ч / <i>Process time, h*</i>	
20	60	12	20	60	120	12	
40	120	15	40	120	240	15	
60	180	18	60	180	360	18	
80	240	21	80	240	480	21	
100	300	24	100	300	600	24	
Вариант III (2 плиты) / <i>Option III (two plates)</i>							
Площадь плиты I с продуктом, % / <i>Plate area I with product, %</i>	Количество ампул / <i>Number of ampoules</i>	Время процесса, ч / <i>Process time, h*</i>	Площадь плиты II с продуктом, % / <i>Plate area II with product, %</i>	Количество ампул / <i>Number of ampoules</i>	Всего ампул / <i>Total ampoules</i>	Время процесса, ч / <i>Process time, h*</i>	
20	60	12	100	300	360	24	
40	120	15	80	240	360	21	
60	180	18	60	180	360	18	
80	240	21	40	120	360	15	
100	300	24	20	60	360	12	
(по совпадению tn и tma) / <i>(coincidence of tn and tma)</i>							

*(по совпадению t_n и t_{ma}) / *(coincidence of t_n and t_{ma})

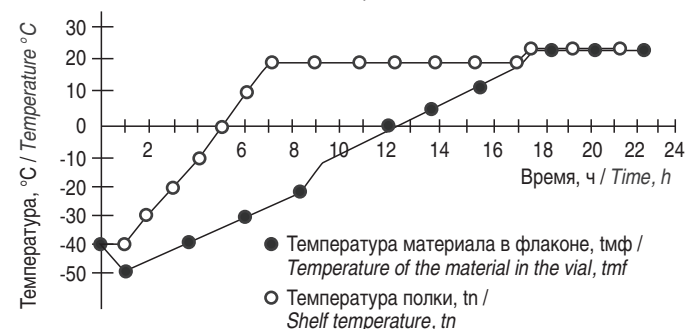
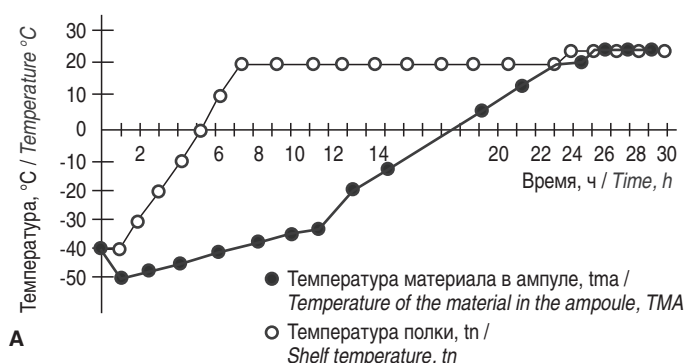


Рис. 4. Кинетика сушки препаратов в ампулах (а) и флаконах (б).
Fig. 4. Kinetics of drying drugs in ampoules (a) and vials (b).

20°C, нагрев до 25°C и выдерживание при ней в течение 6 ч). Полученные данные представлены на рис. 4.

Данные рис. 4 позволяют сделать вывод о том, что с увеличением высоты материала в первичной упаковке при одном и том же его количестве возрастает время лиофилизации препаратов.

Особенности лиофилизации при разной величине загрузки плит продуктового отсека и взаиморасположения кювет с препаратом

В табл. 2 представлены результаты экспериментов по лиофилизации продукта при разном количестве ампул, помещенных на плиты лиофилизатора, при одинаковых режимах температуры полок и рабочего вакуума. Из этих данных следует, что продолжительность лиофилизации значительно увеличивается с расширением поверхности, занимаемой продуктом на плите, – время процесса при максимальном заполнении плиты в 2 раза больше, чем при заполнении на 20%. Также выявлено, что длительность лиофилизации обуславливается поверхностью загрузки плит установки, а не их количеством. При максимальной заполняемости двух плит длительность процесса аналогична таковой при максимальной заполняемости одной плиты. Таким образом, максимальная заполняемость одной плиты моделирует полную загрузку лиофилизатора. Результаты исследований позво-

Табл. 3. Пределы изменения показателей, взаимосвязь кодированного параметра X_i и натурального Z_i
Table. 3. Limits of change in indicators, the relatio of the coded parameter X_i and natural Z_i

Показатели / Parameters	Базовое значение / Basic meaning	Предел изменения / Limit of Changes	Максимальный предел изменения / (+) Maximum limit of change	Минимальный предел изменения (-) / Minimum limit of change (-)	Взаимосвязь кодированного параметра и натурального / The relatio of the coded parameter and natural
Z1 – температура десорбции, °C / Z1 – desorption temperature, °C	25,0	5,0	30,0	20,0	$X_1 = (Z_1 - 25)/5$
Z2 – продолжительность десорбции, ч / Z2 – duration of desorption, h	6	4	10	2	$X_2 = (Z_2 - 6)/4$

ляют сформулировать практическое предложение: следует избегать расположения продукта на одной плите продуктового отсека, а размещать его одинаковыми частями на каждой плите. Это позволит уменьшить время сушки.

Разработка прогностической модели определения времени десорбции с целью нахождения необходимой величины ПМВ

Для разработки прогностической модели, позволяющей рассчитывать значения ПМВ препаратов, был проведен ПФЭ 22. Изучаемыми показателями, воздействующими на величину ПМВ, приняты температура и продолжительность десорбции. Величины данных показателей принимались в пределах, которые используются в регламентированной технологии сублимационной сушки холерных диагностических сывороток.

В табл. 3 показаны пределы изменения показателей, взаимосвязь кодированного параметра X_i и натурального Z_i . Данные табл. 4 отражают программу проектирования ПФЭ и его итоги.

Для двух показателей, что применимо в наших экспериментах, базовая модель была следующей:

$$Y(b, X) = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_{1,2} X_1 X_2, \quad (1)$$

где $Y(b, X)$ – целевая функция, b – коэффициенты регрессии при кодированных параметрах X .

В табл. 5. изложены результаты статистической обработки данных реализованных опытов.

Выражение (1) с использованием вычисленных коэффициентов будет иметь вид:

$$Y = 1,275 - 0,375X_1 - 0,725X_2. \quad (2)$$

С достоверностью $P = 95\%$ при $t_{кр} = 2,78$ и адекватности модели $F_{расч} = 6,9$ выявлена значимость всех коэффициентов уравнения (2), которое в натуральных величинах факторов приобрело вид:

$$Y = 1,275 - 0,375 ((Z_1 - 25)/5) - 0,725((Z_2 - 6)/4). \quad (3)$$

На заключительном этапе исследований определяли соответствие определенных по выражению (3) и выявленных опытным путем ПМВ при тех величинах температуры и продолжительности десорбции, которые не участвовали в экспериментах. С целью реализации опытов взяты: 15°C, 1 ч. Определенное по выражению (3) значение ПМВ было 2,3%, а выявленное в ходе лиофилизации – 2,25%. Это также служит доказательством адекватности выражения (12).

Табл. 4. Программа ПФЭ и его итоги
Table. 4. The CFE program and results

Показатель / Parameters		ПМВ (Y), % / PMV			
X_1	X_2	Y_1	Y_2	Y_3	$Y_{ср}$
+	+	0,1	0,3	0,2	0,2
-	+	0,9	1,1	0,8	0,9
+	-	1,6	1,6	1,6	1,6
-	-	2,6	2,4	2,2	2,4

Табл. 5. Результаты статистической обработки данных реализованных опытов
Table. 5. Results of statistical processing of data from implemented experiments

b_0	b_1	b_2	$b_{1,2}$	$t_{кр} S_{коэф}$
1,275	-0,375	-0,725	0,025	0,13

$F_{табл} = 7,71$; $F_{расч} = 6,9$, где
 $t_{кр}$ – критическая точка, определенная по таблице распределения Стьюдента [1]; $S_{коэф}$ – коэффициент, рассчитанный по данным эксперимента; $F_{табл}$ – критерий Фишера, определенный по таблице критических точек распределения Фишера [1]; $F_{расч}$ – критерий Фишера, рассчитанный по данным эксперимента
 $t_{кр}$ – critical point determined by the Student's table distribution [1]; S_{cr} – coefficient calculated from the data of the experiment; F_{table} – Fisher's criterion determined from the table of critical points of the Fisher distribution [1]; F_{rassch} – Fisher's criterion calculated from the experiment

Коэффициенты X_1 (температура десорбции) и X_2 (продолжительность десорбции) имеют знак «минус». Данное обстоятельство позволяет утверждать следующее: повышение значений этих показателей приводит к снижению значения ПМВ.

Заключение

Результаты исследования сублимационной сушки холерных диагностических сывороток в ампулах позволяют сформулировать следующие выводы:

1) на кривой изменения температуры холерной диагностической сыворотки во времени при ее лиофилизации этап сублимации описывается линейным повышением температуры препарата, при этом резкий скачок увеличения температуры свидетельствует об окончании первичной сушки;

2) определены температура полного замерзания (-40°C), нижняя (-35°C) и верхняя (-25°C) эвтектические температуры холерных диагностических сывороток, что дает возможность управлять процессом замораживания и сублимации препаратов;

3) при лиофилизации в ампулах выявлена значительная гетерогенность подвода энергии по площади кюветы. В силу большой боковой площади у материала в ампулах происхо-

дит поглощение продуктом существенного количества направленного тепла за счет конвекции от конструкций продуктового отсека. Первичная сушка в крайних ампулах происходит в 1,5–2 раза интенсивнее, чем в тех, которые находятся ближе к центру кюветы. Отсутствие однородности первичной сушки материала приводит к увеличению продолжительности процесса в силу того, что для недопущения перегрева препарата приходится уменьшать температуру полки;

4) при увеличении высоты материала в первичной упаковке при одном и том же его количестве возрастает время лиофилизации препаратов;

5) продолжительность лиофилизации препарата зависит от заполнения плит и плотности расположения ампул. Время сушки определяется не количеством используемых плит в сушилке, а степенью их заполнения. Итоговое время процесса обуславливается уровнем заполнения продуктом самой загруженной плитой;

6) разработана прогностическая модель, позволяющая определять продолжительность десорбции с целью получения необходимой величины ПМВ при назначенных температуре и продолжительности процесса.

Следует сказать о том, что представленные в данной работе итоги исследований были установлены только для сушилки Martin Christ Epsilon 2-6D. В случае использования других машин технологические параметры лиофилизации продукта могут варьировать. Вместе с тем обоснованные нами приемы установления рационального режима сушки могут быть востребованными также при использовании на сублимационных установках различных наименований. Практика производства выявила, что технологические приемы лиофилизации холерных диагностических сывороток, разработанные с применением сушилки Martin Christ Epsilon 2-6D, с успехом использовались на установке ilShin LP50R (Республика Корея).

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках выполнения НИР 89-2-21 «Научно-прикладные аспекты производства и совершенствования препаратов для иммунопрофилактики и диагностики опасных бактериальных и вирусных инфекций» (номер государственной регистрации АААА-А21-121012090066-4).

Financial support

The work was carried out as part of the implementation of research work 89-2-21 «Scientific and applied aspects of the production and improvement of drugs for immunoprophylaxis and diagnosis of dangerous bacterial and viral infections» (state registration number АААА-А21-121012090066-4).

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. Адлер ЮП, Маркова ЕВ, Грановский ЮВ. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий. М.: Наука, 1971.

2. Комиссаров АВ, Бибииков ДН, Бадарин СА, Синицына НВ, Костылева НИ, Овчинникова МВ, и др. Разработка расчетной зависимости для оценки величины потери массы при лиофилизации диагностических препаратов. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020;10(3):506-14. DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-3-506-514
3. Franks F, Auffret T. Freeze-Drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals. Cambridge, UK: RSCPublishing; 2007. DOI: 10.1039/9781847557704
4. Tang X, Pikal MJ. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. Pharm Res. 2004 Feb;21(2):191-200. DOI: 10.1023/b:pham.0000016234.73023
5. Комиссаров АВ, Бибииков ДН, Волох ОА, Бадарин СА, Синицына НВ, Костылева НИ, и др. Лيوфилизация живых вакцин. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А.Овчинникова. 2018;14(3):56-73. DOI: 10.30906/2073-8099-2020-12-2-13-31
6. Могилук В. Аспекты лиофилизационной сушки водных растворов. Фармацевтическая отрасль. 2014;5(46):46-53.
7. Pikal MJ, Rambhatla S, Ramot R. The Impact of the Freezing Stage in Lyophilization: Effects of the Ice Nucleation Temperature on Process Design and Product Quality. Journal of the American Pharmacists Association. 2002;5:48-53.
8. Гусаров ДА. Лيوфилизация биофармацевтических белков. Биофармацевтический журнал. 2010;2(5):3-7.
9. Rambhatla S, Ramot R, Bhugra Ch, Pikal MJ. Heat and mass transfer scale-up issues during freeze drying: II. Control and characterization of the degree of supercooling. AAPS PharmSciTech. 2004;5(4):54-62. DOI: 10.1208/pt050458
10. Franks F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. Eur J Pharm Biopharm. 1998 May;45(3):221-9. DOI: 10.1016/S0939-6411(98)00004-6
11. Нежута АА, Сербис ЕС. Разработка научно-обоснованных режимов сублимационной сушки биопрепаратов. Биотехнология. 2001;6:59-67.
12. Rey L, May JC. Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products. London: Informa Healthcare; 2010.
13. Комиссаров АВ, Кочкалова НН, Синицына НВ, Бадарин СА, Костылева НИ, Волох ОА, и др. Исследование процесса сублимационного высушивания иммуногенов холерной химической вакцины. Проблемы особо опасных инфекций. 2016;1:90-3. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-90-93
14. Constantino HR, Pikal MJ. Lyophilization of Biopharmaceuticals. Arlington, VA, USA: AAPS Press; 2004.

References

1. Adler YuP, Markova EV, Granovsky YuV. Planning an experiment in the search for optimal conditions. M.: Nauka, 1971. (In Russian).
2. Komissarov AV, Bibikov DN, Badarin SA, Sinitsyna NV, Kostyleva NI, Ovchinnikova MV, et al. Calculation of dependences for estimating the amount of weight loss during lyophilization of diagnostic preparations. Izvestiya vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya (Applied Chemistry and Biotechnology). 2020;10(3):506-514. DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-3-506-514 (In Russian).
3. Franks F, Auffret T. Freeze-Drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals. Cambridge, UK: RSCPublishing; 2007. DOI: 10.1039/9781847557704
4. Tang X, Pikal MJ. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. Pharm Res. 2004 Feb;21(2):191-200. DOI: 10.1023/b:pham.0000016234.73023
5. Komissarov AV, Bibikov DN, Volokh OA, Badarin SA, Sinitsyna NV, Kostyleva NI, et al. Lyophilization of live vaccines. Yu.A.Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology. 2018;14(3):56-73. (In Russian).
6. Mogilyuk V. Aspekty liofilizatsionnoy sushki vodnykh rastvorov. Farmaceuticheskaya otrasl'. 2014;5(46):46-53. (In Russian).
7. Pikal MJ, Rambhatla S, Ramot R. The Impact of the Freezing Stage in Lyophilization: Effects of the Ice Nucleation Temperature on Process Design and Product Quality. Journal of the American Pharmacists Association. 2002;5:48-53.

8. Gusarov DA. Lyophilization of biopharmaceutical proteins. Biopharmaceutical Journal. 2010;2(5):3-7. (In Russian).
9. Rambhatla S, Ramot R, Bhugra Ch, Pikal MJ. Heat and mass transfer scale-up issues during freeze drying: II. Control and characterization of the degree of supercooling. AAPS PharmSciTech. 2004;5(4):54-62. DOI: 10.1208/pt050458
10. Franks F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. Eur J Pharm Biopharm. 1998 May;45(3):221-9. DOI: 10.1016/S0939-6411(98)00004-6
11. Nezhuta AA, Serbis ES. Development of scientifically-substantiated modes for freeze-drying of biological preparations. Biotekhnologiya. 2001;6:59-67. (In Russian).
12. Rey L, May JC. Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products. London: Informa Healthcare; 2010.
13. Komissarov AV, Kochkalova NN, Sinitsyna NV, Badarin SA, Kostyleva NI, Volokh OA, et al. Studies of Freeze-Drying of Cholera Chemical Vaccine Immunogens. Problemy osobo opasnykh infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections). 2016;1:90-93. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-90-93 (In Russian).
14. Constantino HR, Pikal MJ. Lyophilization of Biopharmaceuticals. Arlington, VA, USA: AAPS Press; 2004.

Информация об авторах:

Синицына Наталья Викторовна, научный сотрудник ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Бадарин Сергей Анатольевич, научный сотрудник ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Бибиков Дмитрий Николаевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Костылева Наталья Ивановна, научный сотрудник ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Глазкова Екатерина Алексеевна, младший научный сотрудник ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Феськова Анна Сергеевна, младший научный сотрудник ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Овчинникова Мария Владимировна, кандидат биологических наук, заведующая отделом ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Никифоров Алексей Константинович, доктор биологических наук, заместитель директора ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, профессор кафедры «Микробиология, биотехнология и химия» Саратовского государственного университета генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И.Вавилова

Information about authors:

Natalya V. Sinitsyna, Researcher, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rospotrebnadzor

Sergey A. Badarin, Researcher, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rospotrebnadzor

Dmitry N. Bibikov, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rospotrebnadzor

Natalia I. Kostyleva, Researcher, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rospotrebnadzor

Ekaterina A. Glazkova, Junior Researcher, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rospotrebnadzor

Anna S. Fes'kova, Junior Researcher, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rospotrebnadzor

Maria V. Ovchinnikova, PhD (Biological Sciences), Department Head, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rospotrebnadzor

Alexey K. Nikiforov, PhD, DSc (Biological Sciences), Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rospotrebnadzor; Professor of the Department of Microbiology, Biotechnology and Chemistry, N.I.Vavilov Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering

НОВОСТИ НАУКИ

Генетический переключатель контролирует колонизацию поверхности клетками *Pseudomonas aeruginosa*

Эффективная колонизация поверхностей слизистых оболочек имеет важное значение для условно-патогенных микроорганизмов, таких как *Pseudomonas aeruginosa*, но то, как бактерии коллективно и индивидуально адаптируются для оптимизации адгезии, вирулентности и распространения, в значительной степени неясно. Здесь мы идентифицировали стохастический генетический переключатель, *hecR-hecE*, который экспрессируется бимодально и генерирует функционально различные бактериальные субпопуляции, чтобы сбалансировать рост и распространение *P. aeruginosa* на поверхностях. *HecE* ингибирует фосфодиэстеразу BifA и стимулирует дигуанилатциклазу WspR, повышая уровни вторичного мессенджера c-di-GMP и способствуя поверхностной колонизации в субпопуляции клеток; *HecE*-экспрессирующие клетки с низким уровнем диспергируются. Доля клеток *HecE*⁺ регулируется различными факторами стресса и определяет баланс между образованием биопленки и распространением клеток на большие расстояния в сообществах, выращенных на поверхности. Мы также демонстрируем, что путь *HecE* представляет собой лекарственную мишень для эффективного противодействия поверхностной колонизации *P. aeruginosa*. Выявление таких бинарных состояний открывает новые способы борьбы с инфекциями слизистых оболочек, вызываемыми основным патогеном человека.



Manner C, Dias Teixeira R, Saha D, et al.

A genetic switch controls *Pseudomonas aeruginosa* surface colonization. Nat Microbiol. 2023 Aug;8(8):1520-1533. DOI: 10.1038/s41564-023-01403-0

Антибактериальные свойства комплексов оксидов различных металлов в отношении *Pseudomonas aeruginosa* и их цитосовместимость

Е.М.Гордина¹, С.А.Божкова¹, Д.В.Лабути¹, А.А.Ерузин², М.В.Богма²

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Р.Р.Вредена», Санкт-Петербург, Российская Федерация;

²«Радиотехкомплект», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Микробная устойчивость к различным антибактериальным препаратам является одной из глобальных проблем современного мира. Лечение инфекций, вызванных резистентными к антибиотикам бактериями, представляет значимую проблему как для системы здравоохранения, так и для пациентов. Поиск альтернативных средств борьбы с устойчивыми патогенами направлен на изучение антибактериальных свойств различных соединений, в т.ч. содержащих частицы металлов. В экспериментах *in vitro* и *ex vivo* изучены способность комплексов оксидов металлов, нанесенных на полимер природного происхождения, подавлять рост *Pseudomonas aeruginosa* и их влияние на эукариотические клетки. Все изученные комплексы демонстрировали выраженное антибактериальное действие в отношении *P. aeruginosa*, однако при этом наибольшей цитосовместимостью характеризовался ZnO/AgO. Полученные результаты позволяют рассматривать данный комплекс как перспективное покрытие для разработки новых альтернативных терапевтических стратегий для лечения инфекций, вызванных *P. aeruginosa*, в т.ч. ассоциированных с различными имплантатами.

Ключевые слова: оксид серебра, антибиотикорезистентность, цитосовместимость, *Pseudomonas aeruginosa*, имплантат-ассоциированная инфекция

Для цитирования: Гордина Е.М., Божкова С.А., Лабути Д.В., Ерузин А.А., Богма М.В. Антибактериальные свойства комплексов оксидов различных металлов в отношении *Pseudomonas aeruginosa* и их цитосовместимость. Бактериология. 2023; 8(2): 42–48. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-42-48

Complexes of various metals oxides: antibacterial properties of against *Pseudomonas aeruginosa* and cytocompatibility

Е.М.Gordina¹, S.A.Bozhkova¹, D.V.Labutin¹, A.A.Eruzin², M.V.Bogma²

¹Vreden National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics, Saint Petersburg, Russian Federation;

²JSC «Radiotekhhkomplekt», Saint Petersburg, Russian Federation

Microbial resistance against various antibacterial drugs is one of the global problems of the modern world. Treatment of infections caused by antibiotic-resistant bacteria is a significant challenge for both the healthcare system and patients. The search for alternative means of combating resistant pathogens is aimed at studying the antibacterial properties of various compounds, including those containing metal particles. *In vitro* and *ex vivo* experiments, the ability of metal oxide complexes deposited on a polymer of natural origin to suppress the growth of *Pseudomonas aeruginosa* and their effect on eukaryotic cells was studied. All studied complexes demonstrated a pronounced antibacterial effect against *P. aeruginosa*, however, ZnO/AgO was characterized by the highest cytocompatibility. The obtained results allow us to consider this complex as a promising coating for the development of new alternative therapeutic strategies for the treatment of infections caused by *P. aeruginosa*, including those associated with various implants.

Key words: silver oxide, antibiotic resistance, cytocompatibility, *Pseudomonas aeruginosa*, implant-associated infection

For citation: Gordina E.M., Bozhkova S.A., Labutin D.V., Eruzin A.A., Bogma M.V. Complexes of various metals oxides: antibacterial properties of against *Pseudomonas aeruginosa* and cytocompatibility. Bacteriology. 2023; 8(2): 42–48. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-42-48

Для корреспонденции:

Гордина Екатерина Михайловна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения профилактики и лечения раневой инфекции ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Р.Р.Вредена»

Адрес: 195427, Санкт-Петербург, ул. Академика Байкова, 8
Телефон: (964) 339-2508
E-mail: emgordina@win.miiito.ru

Статья поступила 24.05.2023, принята к печати 30.06.2023

For correspondence:

Ekaterina M. Gordina, MD, PhD, senior researcher of the division of wound infection treatment and prevention Vreden National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics

Address: 8 Akademik Baykov str., Saint Petersburg, 192252, Russian Federation
Phone: (964) 339-2508
E-mail: emgordina@win.miiito.ru

The article was received 24.05.2023, accepted for publication 30.06.2023

В настоящее время потребность в медицинских имплантатах (ортопедических, сосудистых, кардиологических и пр.) растет из-за старения населения и, вероятно, будет продолжать расти в будущем. В таких областях медицины, как ортопедия и травматология, практически каждому пациенту, которому выполняют хирургическое вмешательство, устанавливают временный или постоянный имплантат, будь то винт, пластина, стержень или эндопротез. По данным научной литературы, частота развития инфекции протезированного сустава составляет от 2,5% после первичного эндопротезирования тазобедренного или коленного суставов и до 27,6% после ревизионных операций [1], при этом уровень летальности от данного осложнения по результатам различных исследований составляет от 2,99 до 8% [2, 3]. В случае если ревизионная операция была выполнена по поводу уже имеющейся инфекции, частота ее рецидивов составляет от 25 до 67% и во многом определяется характером микробного возбудителя [3]. Таким образом, формируется пул пациентов с хронической ортопедической инфекцией, постоянно требующих не только амбулаторного наблюдения, но и периодических хирургических вмешательств при очередном обострении хронической инфекции. Перипротезная инфекция значительно ухудшает качество жизни пациента, требует продолжительной госпитализации, повторных оперативных вмешательств и пролонгированной дорогостоящей антибиотикотерапии.

По данным разных авторов, в структуре возбудителей ортопедической инфекции доля грамотрицательных бактерий составляет 15–44%, и они все чаще демонстрируют множественную лекарственную устойчивость [4, 5]. Доля случаев выделения *Pseudomonas aeruginosa* при хронической перипротезной инфекции, вызванной грамотрицательными патогенами, может достигать 20% [6]. В свою очередь, участие в этиологии грамотрицательных возбудителей служит прогностически неблагоприятным признаком [7]. Это связано с крайне низкой эффективностью лечения ортопедической имплантат-ассоциированной инфекции, вызванной *P. aeruginosa*. При этом наличие резистентности к β -лактамам и фторхинолонам существенно сужает возможности стартовой парентеральной антибактериальной терапии. Кроме того, устойчивость к фторхинолонам делает невозможным назначение пролонгированной этиотропной антибактериальной терапии, которая является стандартной для лечения инфекции костей и суставов, ввиду отсутствия других пероральных препаратов, активных в отношении данного патогена.

Эпоха микробной устойчивости к антибактериальным препаратам вызывает все большую озабоченность современного здравоохранения, поскольку бактерии продолжают адаптироваться к современным препаратам с высокой скоростью [8]. В 2022 г. опубликованы результаты систематического анализа смертности, вызванной антибиотикорезистентными патогенами. На основе прогностических статистических моделей за 2019 г. было зарегистрировано 4,95 млн смертей, связанных с бактериальной устойчивостью, в т.ч. 1,27 млн смертей, напрямую вызванных антибиотикорезистентными возбудителями [9].

Инфекционный контроль и адекватная патоген-специфичная терапия особенно важны в ортопедической хирургии

из-за обширных операций, связанных с установкой имплантатов, тяжелых последствий для пациента и системы здравоохранения в случае развития имплантат-ассоциированной инфекции, которая в подавляющем большинстве случаев требует замены инфицированного имплантата. Одним из вариантов поиска оптимальных путей контроля тяжелой инфекции, в т.ч. ортопедической, вызванной *P. aeruginosa*, является изучение и разработка новых перспективных методов профилактики развития инфекционного процесса и его рецидивов с использованием оксидов металлов и их комплексов, характеризующихся антибактериальной активностью в отношении возбудителей, в т.ч. резистентных к антибиотикам.

Цель исследования – оценить антибактериальную активность и цитосовместимость комплексов, состоящих из оксидов серебра и других металлов, в отношении *P. aeruginosa*.

Материалы и методы

Получение многокомпонентных покрытий. Полученные покрытия содержали различные комплексы оксидов металлов с оксидом серебра: ZnO/AgO, CuO/AgO, MgO/AgO, TiO₂/AgO, Al₂O₃/AgO. Представлены брутто-формулы комплексов с соотношениями компонентов в оксидах, где количество кислорода и металлов переменное. Пленки оксидов осаждались на подложке (природный полимер с плотностью 80 г/м²) в вакууме методом дугового ионно-плазменного распыления металлической мишени. Мощность разряда – 1500 Вт. Напуск реакционного газа в рабочий объем вакуумной камеры – до 1×10^{-3} мм рт. ст. Одновременные инициация, со-вмещение и конденсация плазменных потоков AgO и оксида другого металла выполнялись в рабочем объеме вакуумной камеры на поверхность подложки под углом 90° друг к другу. Покрытия имели гексагональную или кубическую, а чаще смешанную структуру. Толщину осаждаемого оксида серебра определяли весовым методом по стеклянному образцу-свидетелю на аналитических весах. Толщина составляла 120–150 нм. Испытание адгезии пленок для стеклянного образца-свидетеля проводили методом решетчатого надреза. Отслоений пленок на получаемых образцах не наблюдали, что позволило не применять дополнительный слой. Сминание гибких подложек не приводило к трещинам в покрытиях, испытание на адгезию не удаляло покрытие, показав, что они равномерно прочны.

Микрофотографии образцов с покрытием получали при помощи оптического микроскопа Hirox KH-8700. Микрозондовый элементный анализ в точках и картирование проведены на электронном микроскопе Hitachi TM4000Plus, совмещенном с детектором EDS. Микропробы помещали на двусторонний проводящий углерод, спектры снимали с пробы без дополнительной пробоподготовки при ускоряющем напряжении 15 кВ и в режиме низкого вакуума, рабочее расстояние около 10,0 мм. Анализы проводили в разных точках по всему образцу путем измерения испускаемого рентгеновского излучения.

Микробиологические методы. Первый этап исследования включал изучение антибактериальной активности полученных образцов в отношении эталонного штамма *P. aeruginosa*

ATCC 27853. Далее в исследование были включены 23 клинических изолята *P. aeruginosa*, выделенных из биоматериала пациентов с перипротезной инфекцией и/или остеомиелитом.

Выделение *P. aeruginosa* проводили в соответствии со стандартными ручными методиками, принятыми в лаборатории. Материалом для исследования служили тканевые биоптаты, раневое отделяемое, синовиальная жидкость и удаленные металлоконструкции, полученные от пациентов, находящихся на стационарном лечении за изученный период. Видовую идентификацию выполняли методом MALDI-TOF-MS с использованием системы FlexControl и программного обеспечения MBT Compass 4.1. (Bruker Daltonics, Германия), Score ≥ 2.0 . Всего идентифицировано и протестировано 24 штамма *P. aeruginosa*, включая 6 устойчивых к карбапенемам. Антибиотикочувствительность культур изучали к 11 антибактериальным препаратам (амикацин, имипенем, левофлоксацин, меропенем, тобрамицин, цефепим, цефоперазон/сульбактам, цефтазидим, цефтазидим/авибактам, цiproфлоксацин, колистин) в соответствии с требованиями EUCAST (2022, v.12.0).

Для регистрации антибактериальных свойств оксидных комплексов на образцы размером 1 см^2 наносили по 50 мкл готовой бактериальной суспензии *P. aeruginosa* $0,5$ по McF (1×10^8 КОЕ/мл) и оставляли на 60 мин при комнатной температуре. Через час каждый образец погружали в 3 мл питательной среды LB (в дубликатах). В качестве положительного контроля в LB вносили 50 мкл взвеси бактерий, отрицательный контроль – стерильный LB. Пробирки инкубировали 24 ч при температуре 37°C . Для количественной оценки антибактериальной активности образцов измеряли оптическую плотность питательной среды через сутки инкубации с бактериями в присутствии образцов. Из каждой пробирки в лунки 96-луночного плоскодонного планшета вносили по 200 мкл (в 4 повторях). Оптическую плотность (ОП) измеряли на спектрофотометре при длине волны 600 нм (Spectrostar Nano, Германия). Образцы считали активными в отношении выделенных культур, а штаммы чувствительными к их действию при наличии статистически значимой разницы между значениями ОП инкубационных сред с тестируемыми образцами и положительным контролем.

При наличии видимых признаков роста в пробирках для исключения контаминации выполняли посев бульонных культур на колумбийский агар с последующей идентификацией культур, изучением профиля антибиотикочувствительности и сравнением с изучаемым штаммом.

Культуральные методы. Клетки Vero выращивали в модифицированной среде Dulbecco (DMEM) с высоким содержанием глюкозы, L-глутамина, пирувата натрия, фетальной бычьей сыворотки (10%), пенициллина (100 Ед/мл) и стрептомицина (100 мг/мл) (Capricorn, Германия). Клетки разделяли каждые 72 ч в соотношении 1:3 и заменяли DMEM на свежую. Образцы размером 1 см^2 помещали в 3 мл DMEM с высоким содержанием глюкозы, L-глутамина, пирувата натрия, фетальной бычьей сыворотки (10%), пенициллина (100 Ед/мл) и стрептомицина (100 мг/мл) (Capricorn, Германия). Пробирки инкубировали 24 ч в шейкере (150 об./мин) при $+37^\circ\text{C}$. Далее определяли pH среды в сравнении с контролем без образцов. Оставшиеся экстракты хранили при $+4^\circ\text{C}$ для последую-

щих экспериментов. Жизнеспособность оценивали путем засева 96-луночных культуральных планшетов клетками Vero (2000 в лунку) и инкубации в течение 24 ч до полного прикрепления. Затем добавляли исследуемые экстракты по 200 мкл в лунку. Планшеты инкубировали в течение 72 ч. В лунки добавляли раствор 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (MTT) в конечной концентрации 1 мг/мл. Планшеты инкубировали еще 3 ч. Среду заменяли на 100 мл ДМСО. После этого пластины инкубировали еще 5 мин в шейкере при 200 об./мин. ОП измеряли при 570 и 640 нм на спектрофотометре SPECTROstar Nano (BMG, Германия). Определяли разницу ОП при длине волны 570 и 640 нм с вычитанием среднего значения пустых лунок. Данные нормализовали и определяли долю жизнеспособных клеток как отношение ОП при 570 и 640 нм в лунках с образцами к ОП контрольных лунок.

Статистический анализ. Все эксперименты проводили в 3 повторностях. Результаты были проанализированы с помощью программы GraphPad Prism 9.0 (США). Данные представлены в виде средних значений со стандартными отклонениями. Результаты оценивали методом одностороннего дисперсионного анализа ANOVA с последующим тестом Даннетта. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты исследования

По результатам полуколичественного микрозондового элементного анализа покрытия с оксидом серебра в точках среднее содержание серебра составило 47,45%. Картирование демонстрировало равномерное распределение данного соединения по поверхности образца (рис. 1).

По результатам полуколичественного микрозондового элементного анализа образца с комплексом ZnO/AgO среднее содержание серебра в точках было 30,89%, цинка – 48,98%. На рис. 2 представлен спектр покрытия с комплексом ZnO/AgO.

Картирование показало равномерное распределение серебра и цинка по поверхности носителя (рис. 3).

Все тестируемые образцы (ZnO/AgO, CuO/AgO, MgO/AgO, TiO₂/AgO, Al₂O₃/AgO) характеризовались наличием антибактериальной активности в отношении эталонного штам-

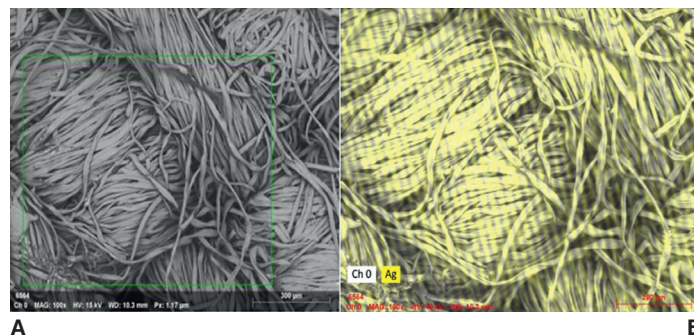


Рис. 1. А – СЭМ-изображение (получено с помощью сканирующего электронного микроскопа) области картирования образца с AgO; Б – СЭМ-изображение распределения по поверхности образца с AgO.

Fig. 1. A – SEM-image (obtained using the scanning electron microscope) of the mapping area of the sample with AgO; B – SEM-image of the distribution over the surface of the sample with AgO.

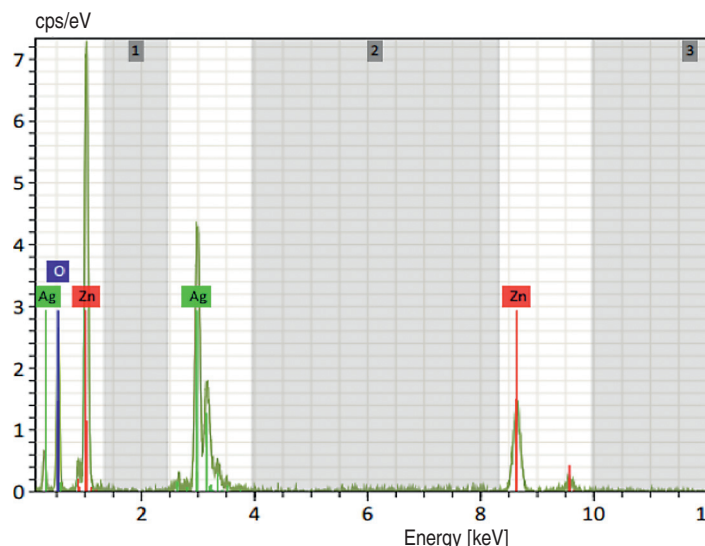


Рис. 2. Спектр элементного состава образца ZnO/AgO.

Fig. 2. Spectrum of the elemental composition of the ZnO/AgO sample.

ма *P. aeruginosa* ATCC 27853. Кроме того, средние значения ОП опытных сред с клиническими культурами *P. aeruginosa* в присутствии образцов были статистически значимо меньше, чем ОП положительного контроля (рис. 4).

Менее выражены антибактериальные свойства были у образцов $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{AgO}$ и CuO/AgO , к которым были устойчивы 8% клинических штаммов *P. aeruginosa* ($n = 2$). К остальным образцам ZnO/AgO, MgO/AgO, TiO_2/AgO регистрировали

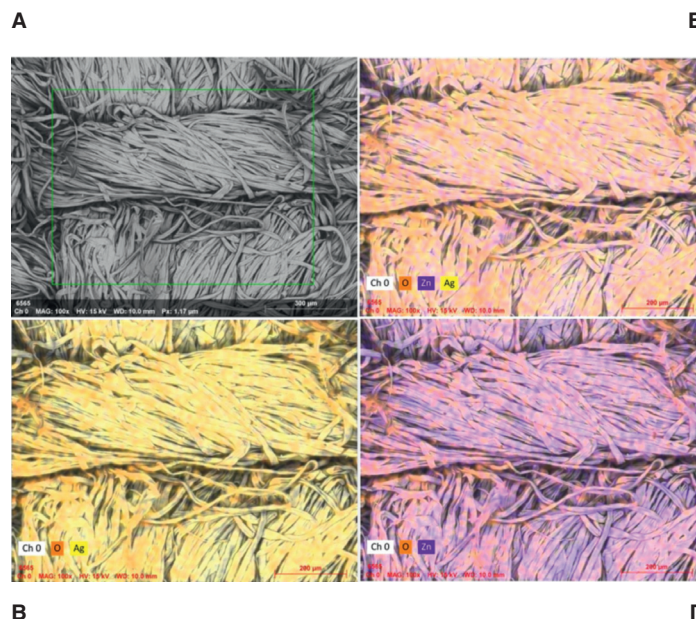


Рис. 3. А – СЭМ-изображение области картирования образца с ZnO/AgO на поверхности носителя; Б – СЭМ-изображение распределения серебра (показано желтым цветом) и цинка (фиолетовым); В – СЭМ-изображение распределения серебра (показано желтым цветом), Г – СЭМ-изображение распределения цинка (показано фиолетовым цветом).

Fig. 3. A – SEM-image of the mapping area of the sample with ZnO / AgO on the surface of the carrier; B – SEM-image of the distribution of silver (in yellow) and zinc (in purple); C – SEM-image of the distribution of silver (in yellow), D – SEM-image of the distribution of zinc (in purple).

Таблица. Антибиотикограммы клинических штаммов *P. aeruginosa* с различным профилем чувствительности к антибактериальным препаратам
Table. Antibioticograms of clinical strains of *P. aeruginosa* with different sensitivity profiles to antibiotics

Действующий компонент / Active component	Штамм <i>P. aeruginosa</i> / Culture of <i>P. aeruginosa</i>							
	<u>1778</u>	<u>6727</u>	1948	1711	2833	1819	5019	6460
Антибактериальные препараты / Antibiotics								
Амикацин / Amikacin	S	S	R	R	R	R	R	S
Имипенем / Imipenem		I	R	R	R	R	R	R
Левифлоксацин / Levofloxacin	I	I	R	R	R	R	R	R
Меропенем / Meropenem	S	S	R	R	R	R	R	R
Тобрамицин / Tobramycin	S	S	R	R	R	R	R	R
Цефепим / Cefepime	I	I	R	R	R	R	R	R
Цефоперазон/сульбактам / Cefoperazone/sulbactam	S	S	R	R	R	R	R	R
Цефтазидим / Ceftazidime	I	I	R	R	R	R	R	R
Цефтазидим/авибактам / Ceftazidime/avibactam		S	R	R	R	R	R	S
Ципрофлоксацин / Ciprofloxacin	I	I	R	R	R	R	R	R
Колистин / Colistin			S	S	S	S	S	S
Комплексы оксидов металлов / Complex of metal oxides								
ZnO/AgO	R	S	S	S	S	S	S	S
CuO/AgO	R	R	S	S	S	S	S	S
MgO/AgO	R	S	S	S	S	S	S	S
TiO ₂ /AgO	R	S	S	S	S	S	S	S
Al ₂ O ₃ /AgO	R	R	S	S	S	S	S	S

Подчеркнуты номера карбапенем-чувствительных штаммов, жирным – карбапенем-резистентные. S – чувствительные; I – чувствительные при повышенной экспозиции препарата; R – устойчивые.

Numbers of carbapenem-sensitive strains are underlined, carbapenem-resistant are bold. S – sensitive; I – sensitive with increased exposure of medicine; R – resistant.

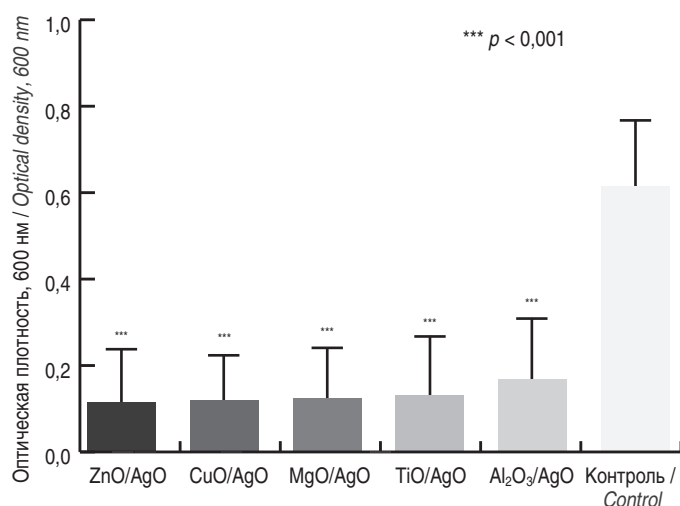


Рис. 4. Сравнение средних значений оптической плотности питательной среды с бактериями в присутствии образцов комплексов оксидов и контроля.

Fig. 4. Comparison of the average values of the optical density of the nutrient medium with bacteria in the presence of samples of oxide complexes and control.

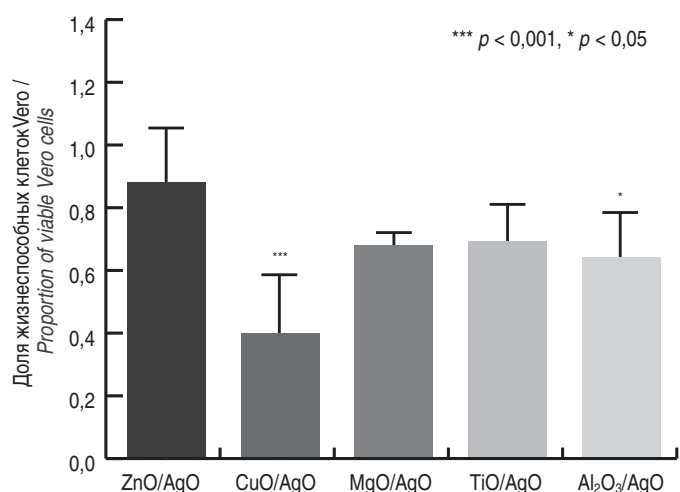


Рис. 5. Доля жизнеспособных клеток Vero в присутствии различных образцов комплексов оксидов металлов.

Fig. 5. The proportion of viable Vero cells in the presence of various samples of metal oxide complexes.

устойчивость у 4% ($n = 1$). Отмечено, что 1 изолят *P. aeruginosa* демонстрировал резистентность ко всем тестируемым комплексам оксидов, но при этом характеризовался чувствительностью к различным антибиотикам (таблица).

Показано, что восприимчивость штаммов *P. aeruginosa* к действию различных комплексов оксидов металлов не связана с их фенотипом чувствительности к антибактериальным препаратам. Так, все карбапенем-резистентные изоляты *P. aeruginosa* характеризовались чувствительностью к тестируемым комплексам оксидов. По-видимому, различия в механизмах антибактериального действия антибиотиков и наночастиц соединений металлов обеспечивают эффективность бактерицидных свойств полученных комплексов в отношении большинства тестируемых штаммов *P. aeruginosa* (рис. 5).

Регистрировали сдвиг pH экстрактов в щелочную сторону по сравнению с контрольной средой для культивирования, что можно объяснить накоплением ионов металлов из об-

разцов. После 72 ч воздействия экстрактов всех образцов установлено значительное негативное воздействие на жизнеспособность эукариотических клеток образцов CuO/AgO и Al₂O₃/AgO. В меньшей степени проявляли цитотоксичность MgO/AgO, TiO₂/AgO. Наибольшей цитосовместимостью характеризовался комплекс ZnO/AgO.

Обсуждение

В настоящее время известны различные подходы к лечению инфекций, вызванных устойчивыми к антибиотикам штаммами бактерий, в т.ч. назначение ингибиторов β -лактамаз [10, 11], новые модификации традиционных антибиотиков, противомикробные пептиды, ингибиторы системы Quorum Sensing [12, 13], бактериофаготерапия [14] и другие методы. Кроме того, ряд исследований показал, что наночастицы металлов являются многообещающей альтернативой антибиотикам из-за их высокой активности против значительного спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий [15]. В нашем исследовании были протестированы 5 оксидов металлов – цинка, меди, магния, титана и алюминия – в комплексе с ранее изученным нами оксидом серебра [16]. Все изученные комплексы ZnO/AgO, CuO/AgO, MgO/AgO, TiO₂/AgO, Al₂O₃/AgO, нанесенные на полимер природного происхождения, продемонстрировали выраженную антибактериальную активность в отношении штаммов *P. aeruginosa*, более выраженную у комплексов с цинком, магнием и титаном.

Известно, что антибактериальное действие оксидов всех металлов определяется единым механизмом – выделением из наночастиц активных форм кислорода, которые повреждают ДНК, белки, липиды, ингибируют функции дыхательных ферментов и вызывают разрушение бактериальной клетки [17–19]. Протестированные нами комплексы оксидов различных металлов в комбинации с оксидом серебра были активны в отношении 92–96% изученных культур *P. aeruginosa* ($n = 23$) в зависимости от состава покрытия. Установлено, что чувствительность к действию наночастиц оксидов металлов не зависела от чувствительности штаммов к антибактериальным препаратам. Так, два чувствительных к антибиотикам изолята *P. aeruginosa* были устойчивы к действию образцов CuO/AgO и Al₂O₃/AgO, в то время как все карбапенем-резистентные штаммы с экстремально-резистентным XDR-фенотипом устойчивости демонстрировали чувствительность ко всем изученным комплексам оксидов металлов.

Sushma N.J. et al. в своем исследовании показали, что наночастицы магния и его сплавы проявляют противовоспалительную и антиоксидантную активности [20]. Nguyen N.T. et al. изучали наноматериалы с частицами оксида магния, покрывающие ортопедические имплантаты, используемые в качестве каркасов для регенерации костной ткани. Авторы показали, что исследуемые покрытия с оксидом магния характеризовались антибактериальным действием в отношении *Escherichia coli* и *Staphylococcus epidermidis* [21].

Исследования наноматериалов привели к сообщениям о возможной связи между их морфологическими характеристиками и проявляемой цитотоксичностью. Ivask et al. установили, что размер и поверхностное покрытие наночастиц

серебра играют значительную роль в его антибактериальной активности, однако наночастицы меньшего размера обеспечивают более высокую цитотоксичность [22]. В нашем исследовании наиболее цитосовместимым был комплекс ZnO/AgO, а наиболее цитотоксичным – комплекс с оксидом меди, статистически значимо снижающий жизнеспособность эукариотических клеток линии Vero.

Также важным фактором цитосовместимости частиц металлов является их растворимость [23]. Vimbela et al. при исследовании цитотоксического действия наночастиц серебра на остеобласты и остеокласты установили, что наночастицы меньшего размера, но с такими же характеристиками показывали более высокую антибактериальную активность, в значительной степени за счет более высоких скоростей ионизации ионов серебра, а также из-за более высокой проникающей способности наночастиц через клеточную стенку бактерий [23]. Кроме того, авторы показали возможность нарушения биосовместимости ортопедических имплантатов из-за цитотоксичности наночастиц серебра в отношении остеобластов и остеокластов. В исследовании, проведенном Pauksch et al., показано, что остеобласты более чувствительны к токсическим эффектам соединений серебра размером <5 нм, чем остеокласты [24].

Редко встречающаяся устойчивость патогенов к наночастицам металлов, по-видимому, связана со значительным количеством мишеней на поверхности и внутри бактериальной клетки, что является одним из преимуществ возможного применения таких соединений в медицине. Многонаправленность действия частиц металлов и их соединений, в т.ч. оксидов, потенциально обеспечивает универсальность использования комплексных покрытий как антибактериальных агентов. Проведенное исследование показало высокую антибактериальную активность всех изученных комплексов оксидов металлов. Установленное отсутствие негативного влияния на жизнеспособность клеток линии Vero оксидов серебра и цинка позволяют рассматривать данный комплекс как перспективный для дальнейших исследований по разработке методов его применения с целью предупреждения и лечения ортопедических инфекций, вызванных *P. aeruginosa*, в т.ч. характеризующихся устойчивостью к различным классам антибактериальных препаратов.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках государственного задания.

Financial support

This work was supported by the government fund.

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. Шубняков ИИ, Тихилов РМ, Денисов АО, Ахмедиллов МА, Черный АЖ, Тотоев ЗА, и др. Что изменилось в структуре ревизионного эндопротезирования тазобедренного сустава в последние годы? Травматология и ортопедия

- для России. 2019;25(4):9-27. / Shubnyakov II, Tikhilov RM, Denisov AO, Akhmedilov MA, Cherny AZh, Totoev ZA, et al. What Has Changed in the Structure of Revision Hip Arthroplasty? *Travmatologiya i ortopediya Rossii* (Traumatology and Orthopedics of Russia). 2019;25(4):9-27. DOI: 10.21823/2311-2905-2019-25-4-9-27 (In Russian).
2. Артюх ВА, Божкова СА, Тихилов РМ, Ярмилко АВ, Муравьева ЮВ. Факторы риска летального исхода после хирургического лечения больных хронической перипротезной инфекцией тазобедренного сустава. *Гений ортопедии*. 2021;27(5):555-561. / Artyukh VA, Bozhkova SA, Tikhilov RM, Yarmilko AV, Muravyova YuV. Risk factors for lethal outcomes after surgical treatment of patients with chronic periprosthetic hip joint infection. *Genij Ortopedii*. 2021;27(5):555-561. DOI:10.18019/1028-4427-2021-27-5-555-561 (In Russian).
3. Gundtoft PH, Pedersen AB, Varnum C, Overgaard S. Increased Mortality After Prosthetic Joint Infection in Primary THA. *Clin Orthop Relat Res*. 2017 Nov;475(11):2623-2631. DOI: 10.1007/s11999-017-5289-6
4. Божкова СА, Касимова АР, Тихилов РМ, Полякова ЕМ, Рукина АН, Шабанова ВВ, и др. Неблагоприятные тенденции в этиологии ортопедической инфекции: результаты 6-летнего мониторинга структуры и резистентности ведущих возбудителей. *Травматология и ортопедия России*. 2018;24(4):20-31. / Bozhkova SA, Kasimova AR, Tikhilov RM, Polyakova EM, Rukina AN, Shabanova VV, et al. Adverse Trends in the Etiology of Orthopedic Infection: Results of 6-Year Monitoring of the Structure and Resistance of Leading Pathogens. *Travmatologiya i ortopediya Rossii* (Traumatology and Orthopedics of Russia). 2018;24(4):20-31. DOI: 10.21823/2311-2905-2018-24-4-20-31 (In Russian).
5. Wang L, Di Luca M, Tkhalishvili T, Trampuz A, Gonzalez Moreno M. Synergistic Activity of Fosfomycin, Ciprofloxacin, and Gentamicin Against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Front Microbiol*. 2019 Nov 6;10:2522. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02522
6. Brooks JR, Dusane DH, Moore K, Gupta T, Delury C, Aiken SS, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm killing beyond the spacer by antibiotic-loaded calcium sulfate beads: an *in vitro* study. *J Bone Jt Infect*. 2021 Mar 23;6(5):119-129. DOI: 10.5194/jbji-6-119-2021
7. Bozhkova S, Tikhilov R, Labutin D, Denisov A, Shubnyakov I, Razorenov V, et al. Failure of the first step of two-stage revision due to polymicrobial prosthetic joint infection of the hip. *J Orthop Traumatol*. 2016 Dec;17(4):369-376. DOI: 10.1007/s10195-016-0417-8
8. Sabtu N, Enoch DA, Brown NM. Antibiotic resistance: what, why, where, when and how? *Br Med Bull*. 2015;116:105-13. DOI: 10.1093/bmb/ldv041
9. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022 Feb 12;399(10325):629-655. Erratum in: *Lancet*. 2022 Oct 1;400(10358):1102. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0
10. Schillaci D, Spanò V, Parrino B, Carbone A, Montalbano A, Barraja P, et al. Pharmaceutical Approaches to Target Antibiotic Resistance Mechanisms. *J Med Chem*. 2017 Oct 26;60(20):8268-8297. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00215
11. Dickey SW, Cheung GYC, Otto M. Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. *Nat Rev Drug Discov*. 2017 Jul;16(7):457-471. DOI: 10.1038/nrd.2017.23
12. Assis LM, Nedeljković M, Dessen A. New strategies for targeting and treatment of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Drug Resist Updat*. 2017 Mar;31:1-14. DOI: 10.1016/j.drug.2017.03.001
13. Askoura M, Saleh M, Abbas H. An innovative role for tenoxicam as a quorum sensing inhibitor in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Microbiol*. 2020 Apr;202(3):555-565. DOI: 10.1007/s00203-019-01771-4
14. Tkhalishvili T, Winkler T, Müller M, Perka C, Trampuz A. Bacteriophages as Adjuvant to Antibiotics for the Treatment of Periprosthetic Joint Infection Caused by Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Dec 20;64(1):e00924-19. DOI: 10.1128/AAC.00924-19

15. Talapko J, Matijević T, Juzbašić M, Antolović-Požgain A, Škrlec I. Antibacterial Activity of Silver and Its Application in Dentistry, Cardiology and Dermatology. *Microorganisms*. 2020 Sep 11;8(9):1400. DOI: 10.3390/microorganisms8091400
16. Гордина ЕМ, Божкова СА, Ерузин АА. Сравнительная оценка антибактериальной активности оксидов серебра с различным содержанием кислорода. Сибирское медицинское обозрение. 2021;2:23-28. / Gordina EM, Bozhkova SA, Erusin AA. Comparative evaluation of antibacterial activity of silver oxides with different oxygen content. *Siberian Medical Review*. 2021;2:23-28. DOI: 10.20333/2500136-2021-2-23-28 (In Russian).
17. Niño-Martínez N, Salas Orozco MF, Martínez-Castañón GA, Torres Méndez F, Ruiz F. Molecular Mechanisms of Bacterial Resistance to Metal and Metal Oxide Nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun 8;20(11):2808. DOI: 10.3390/ijms20112808
18. Wei Y, Wang J, Wu S, Zhou R, Zhang K, Zhang Z, et al. Nanomaterial-Based Zinc Ion Interference Therapy to Combat Bacterial Infections. *Front Immunol*. 2022 Jun 30;13:899992. DOI: 10.3389/fimmu.2022.899992
19. Das D, Nath BC, Phukon P, Dolui SK. Synthesis and evaluation of antioxidant and antibacterial behavior of CuO nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013 Jan 1;101:430-3. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.07.002
20. Sushma NJ, Prathyusha D, Swathi G, et al. Facile approach to synthesize magnesium oxide nanoparticles by using *Clitoria ternatea* – characterization and *in vitro* antioxidant studies. *Appl Nanosci*. 2016; 6(3):437-444. DOI:10.1007/s13204-015-0455-1
21. Nguyen NT, Grelling N, Wetteland CL, Rosario R, Liu H. Antimicrobial Activities and Mechanisms of Magnesium Oxide Nanoparticles (nMgO) against Pathogenic Bacteria, Yeasts, and Biofilms. *Sci Rep*. 2018 Nov 2;8(1):16260. DOI: 10.1038/s41598-018-34567-5
22. Ivask A, Elbadawy A, Kaweeteerawat C, Boren D, Fischer H, Ji Z, et al. Toxicity mechanisms in *Escherichia coli* vary for silver nanoparticles and differ from ionic silver. *ACS Nano*. 2014 Jan 28;8(1):374-86. DOI: 10.1021/nn4044047
23. Vimbela GV, Ngo SM, Frazee C, Yang L, Stout DA. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. *Int J Nanomedicine*. 2017 May 24;12:3941-3965. Erratum in: *Int J Nanomedicine*. 2018 Oct 16;13:6497. DOI: 10.2147/IJN.S134526
24. Pauksch L, Hartmann S, Rohnke M, Szalay G, Alt V, Schnettler R, et al. Biocompatibility of silver nanoparticles and silver ions in primary human mesenchymal stem cells and osteoblasts. *Acta Biomater*. 2014 Jan;10(1):439-49. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.09.037.

Информация о соавторах:

Божкова Светлана Анатольевна, доктор медицинских наук, заведующая научным отделением профилактики и лечения раневой инфекции и отделением клинической фармакологии, профессор кафедры травматологии и ортопедии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Р.П.Вредена»

Лабутин Дмитрий Владимирович, младший научный сотрудник отделения профилактики и лечения раневой инфекции ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Р.П.Вредена»

Ерузин Александр Анатольевич, кандидат технических наук, инженер участка вакуумной металлизации, специалист в области низкотемпературной плазмы АО «Радиотехкомплект»

Богма Марина Владимировна, кандидат фармацевтических наук, специалист в области низкотемпературной плазмы АО «Радиотехкомплект»

Information about co-authors:

Svetlana A. Bozhkova, MD, PhD, DSc, Head of the Scientific Department of Wound Infection Treatment and Prevention and the Department of Clinical Pharmacology, Professor of Vreden National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics

Dmitry V. Labutin, Junior Researcher, Department of Prevention and Treatment of Wound Infection, Vreden National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics

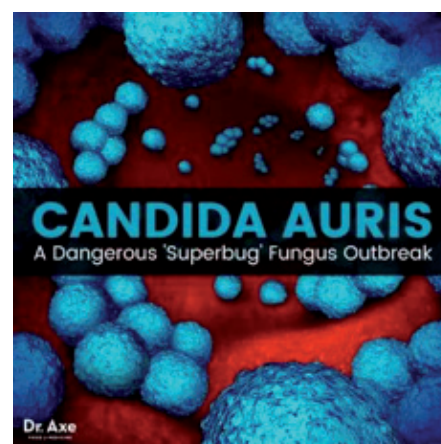
Alexander A. Erusin, PhD of Technical Sciences, Engineer of the Vacuum Metallization Section, Specialist in the Field of Low-Temperature Plasma JSC «Radiotekhnokomplekt»

Marina V. Bogma, PhD in Pharmaceutical Sciences, Specialist in the Field of Low-Temperature plasma JSC «Radiotekhnokomplekt»

НОВОСТИ НАУКИ

Смертельный для человека патоген был обнаружен у собак

Candida auris представляет собой новую глобальную угрозу для общественного здравоохранения и устойчива к большинству противогрибковых препаратов. Хотя грибы являются важными патогенами для животных, роль *C. auris* в их здоровье остается неизученной. Проанализировали микробные культуры мазков кожи и ушей 87 собак в Дели и выполнили секвенирование грибковых мета-штрих-кодов образцов ушей и кожи 7 собак с подтвержденным наружным отитом (НО). В целом, у 4,5% собак (4/87) с хроническими инфекциями кожи были обнаружены признаки *C. auris* в слуховом проходе ($n = 3$) и на поверхности кожи ($n = 1$). Из трех собак с ОЕ с инфекцией/колонизацией *C. auris* наблюдалось разнообразие грибов, и их ITS-последовательность мета-штрих-кода читалась для *C. auris* в диапазоне от 0,06 до 0,67%. Полногеномное секвенирование шести штаммов *C. auris*, полученных в культуре от двух собак, показало родство с клиническими штаммами Clade I. В отчете подчеркивается выделение *C. auris* из животного источника; однако пути передачи этих дрожжей собакам и клиническое значение передачи между собаками и людьми еще предстоит изучить.



Yadav A, Wang Y, Jain K, Panwar VAR, Kaur H, Kasana V, et al.
Candida auris in Dog Ears.
J Fungi (Basel). 2023 Jun 30;9(7):720. DOI: 10.3390/jof9070720

Учебные штаммы бруцелл для профессиональной переподготовки бактериологов, эпидемиологов и лаборантов

Т.П.Шмелькова, Т.А.Малюкова, Г.В.Чеховская, Н.А.Осина, В.Г.Германчук, Ю.А.Попов

ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб», Роспотребнадзора, Саратов, Российская Федерация

Сформирован учебный набор из 7 штаммов бруцелл, обеспечивающий изучение регламентированных методов лабораторной диагностики бруцеллеза при профессиональной переподготовке бактериологов, эпидемиологов, лаборантов для работ с возбудителями особо опасных инфекций. Применение набора обусловило расширение спектра профессиональных умений и навыков, приобретаемых слушателями курсов, а также снижение риска лабораторного инфицирования на практических занятиях. Базовыми принципами снижения биорисков являются использование вакцинного штамма *Brucella abortus* 19 BA обучающимися при освоении лабораторных методов диагностики, а также подготовка культур других штаммов преподавателями, допущенными к работе с патогенными биологическими агентами I–II групп, для демонстрации диагностически значимых биологических свойств бруцелл, отличных от вакцинного штамма.

Ключевые слова: бруцеллез, профессиональная переподготовка, учебный набор штаммов, остаточная вирулентность, диагностически значимые признаки

Для цитирования: Шмелькова Т.П., Малюкова Т.А., Чеховская Г.В., Осина Н.А., Германчук В.Г., Попов Ю.А. Учебные штаммы бруцелл для профессиональной переподготовки бактериологов, эпидемиологов и лаборантов. Бактериология. 2023; 8(2): 49–55. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-49-55

Practice strains of brucella for professional retraining of bacteriologists, epidemiologists and laboratory assistants

T.P.Shmelkova, T.A.Malyukova, G.V.Chekhovskaya, N.A.Osina, V.G.Germanchuk, Yu.A.Popov

Russian Anti-Plague Institute «Microbe» of the Rosпотребнадзор, Saratov, Russian Federation

A training set of 7 brucella strains has been formed, which provides the study of regulated methods of laboratory diagnosis of brucellosis during professional retraining of bacteriologists, epidemiologists, laboratory assistants for work with pathogens of particularly dangerous infections. The use of the kit results in expansion of the range of professional skills acquired by retrainees, as well as a reduction in the risk of laboratory infection in practical classes. The basic principles of reducing biorisks are the use of the *Brucella abortus* 19 BA vaccine strain when mastering laboratory diagnostic methods, as well as the preparation of cultures of other strains by tutors admitted to work with PBAs groups I–II to demonstrate diagnostically significant biological properties of brucella that are different from the vaccine strain.

Key words: brucellosis, professional retraining, training set of strains, residual virulence, diagnostically significant features

For citation: Shmelkova T.P., Malyukova T.A., Chekhovskaya G.V., Osina N.A., Germanchuk V.G., Popov Yu.A. Practice strains of brucella for professional retraining of bacteriologists, epidemiologists and laboratory assistants. Bacteriology. 2023; 8(2): 49–55. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-49-55

Бруцеллез входит в группу самых распространенных зооантропонозных инфекционных болезней, поражающих сельскохозяйственных животных и людей, и характеризуется высокими показателями социально-экономического ущерба [1, 2].

В мероприятия по лабораторной диагностике бруцеллеза вовлечен большой круг специалистов организаций и учреж-

дений Роспотребнадзора, Минздрава, Минсельхоза, для которых обязательным требованием при допуске к работе является профессиональная переподготовка с освоением правил безопасной работы с патогенами.

Одним из основных учебных модулей программ профессиональной переподготовки бактериологов, эпидемиологов и лаборантов для работ с возбудителями особо опасных ин-

Для корреспонденции:

Шмелькова Татьяна Петровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУН «Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (904) 240-8143
E-mail: training@microbe.ru

Статья поступила 26.05.2023, принята к печати 30.06.2023

For correspondence:

Tatyana P. Shmelkova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, Department of Educational Programs and Training of Specialists, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rosпотребнадзор

Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Телефон: (904) 240-8143
E-mail: training@microbe.ru

The article was received 26.05.2023, accepted for publication 30.06.2023

фекций является модуль «Микробиология и лабораторная диагностика бруцеллеза», дающий возможность приобрести профессиональные теоретические знания, практические умения и навыки выполнения регламентированных методов индикации и идентификации бруцелл.

Традиционно в качестве базового штамма при проведении практических занятий используют вакцинный штамм *Brucella abortus* 19 BA, который, наряду с явными преимуществами (в первую очередь низкий показатель вирулентности), не может перекрыть весь спектр значимых для диагностики биологических свойств патогенных для человека бруцелл видов *B. melitensis*, *B. suis* и других, что определяет необходимость создания учебного набора штаммов. Однако при совершенствовании учебного процесса следует учитывать один из принципов обеспечения биобезопасности практических занятий – исключение или сокращение использования патогенных микроорганизмов путем замены вирулентных штаммов на менее вирулентные, в т.ч. вакцинные или авирулентные [3].

Цель работы: сформировать учебный набор штаммов возбудителей бруцеллеза, содержащий преимущественно авирулентные штаммы, позволяющие снизить риск инфицирования слушателей курсов при самостоятельной работе на практических занятиях и освоить свойства, базовые для лабораторной диагностики бруцеллеза регламентированными методами индикации и идентификации.

Материалы и методы

При формировании требований к штаммам учебного набора руководствовались законодательными и подзаконными актами Российской Федерации, нормативными и методическими документами по лабораторной диагностике бруцеллеза и биобезопасности при работе с патогенами; программами профессиональной переподготовки специалистов по особо опасным инфекциям [4–8]. С учетом сформулированных нами критериев на основании паспортных данных проводили отбор штаммов *Brucella* spp. из числа депонированных в Государственной коллекции патогенных бактерий (ГКПБ) на базе ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб».

Методы исследования: аналитический; культурально-морфологический, биохимические, иммунологические, биологический, молекулярно-генетический, регламентированные при лабораторной диагностике бруцеллеза.

Культуры микроорганизмов выращивали на бруцелла-бульоне и бруцеллагаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), pH 6,9, в течение 48 ч. Для восстановления биологических свойств после хранения культуры прошли пассирование через организм чувствительных животных – белых мышей (анимализацию) – с последующим отбором типичных колоний, выросших на плотной питательной среде из посевов печени, селезенки и крови.

Вирулентность исследуемых штаммов определяли по величине инфицирующей дозы (ИД₅₀) для беспородных белых мышей и морских свинок.

При определении инфицирующей дозы для белых мышей (18–20 г) взвеси двухсуточных агаровых культур бруцелл второго пассажа в концентрациях 2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 ,

2×10^3 , 2×10^2 м.к./мл вводили подкожно во внутреннюю поверхность бедра в объеме 0,5 мл. Каждым разведением заражали группу из 6 животных. Через 14 суток проводили гуманную эвтаназию и срезом селезенки делали высевы отпечатком на бруцеллагар. Посевы инкубировали 4–6 суток, отмечая наличие или отсутствие роста колоний бруцелл.

Расчет вели по формуле:

$$\lg \text{ИД}_{50} = \lg D - \lg n(\sum Z_i - 0,5), \quad (1)$$

где $\lg \text{ИД}_{50}$ – логарифм инфицирующей дозы;

$\lg D$ – логарифм максимальной из испытанных доз;

$\lg n$ – логарифм шага разведения бактериальной взвеси;

Z_i – отношение числа животных с положительным высевом из селезенки к числу зараженных животных;

$\sum Z_i$ – сумма значений Z_i .

При определении инфицирующей дозы для морских свинок (320–380 г) взвеси двухсуточных агаровых культур второго пассажа в концентрации 2×10^9 м.к./мл вводили подкожно во внутреннюю поверхность бедра в объеме 1,0 мл. Одним штаммом заражали группу из 3 животных. Через 14 суток проводили гуманную эвтаназию, селезенки морских свинок каждой группы (3 шт.) объединяли, растирали в ступке, добавляя 3 мл физиологического раствора, и титровали до концентраций 1/10, 1/100 и 1/1000. Цельную суспензию и ее десятикратные разведения высевали по 0,1 мл на 2 пластинки бруцеллагара. После 4–5 суток инкубации проводили подсчет типичных колоний возбудителей бруцеллеза.

Количество бактерий в 1 мл цельной суспензии селезенки морских свинок каждой исследуемой группы рассчитывали по формуле:

$$n = p \times 10 \times d_r, \quad (2)$$

где n – количество бактерий в 1 мл цельной суспензии селезенки,

p – количество типичных колоний на агаровой пластинке,

d_r – коэффициент разведения суспензии: 1 (цельная),

10 (разведение 1/10), 100 (разведение 1/100) и 1000 (разведение 1/1000).

Определяли среднее арифметическое количество бруцелл по каждому разведению.

Морфологию клеток изучали в мазках, окрашенных по Граму, с использованием светового микроскопа «Микмед-5» («ЛОМО», Санкт-Петербург), увеличение $\times 1000$, масляная иммерсия. Морфологию колоний оценивали визуально и под малым увеличением светового микроскопа.

Выявление родоспецифических антигенов осуществляли методом флуоресцирующих антител (МФА) с иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими бруцеллезными сухими (ФКУЗ «Ставропольский НИПЧИ») и в реакции агглютинации (РА) с сывороткой бруцеллезной диагностической поливалентной сухой (ФКУЗ «Иркутский НИПЧИ») в соответствии с инструкцией. Использованные медицинские изделия для *in vitro* диагностики прошли государственную регистрацию на территории Российской Федерации. Просмотр МФА-мазков осуществляли посредством флуоресцентного микроскопа Eclipse 80i (Nicon, Япония), увеличение $\times 1000$, масляная иммерсия.

Изменчивость бруцелл (S-R диссоциация) определяли в пробе Уайт–Вильсона.

Межвидовую дифференциацию проводили по отношению к избыточному содержанию CO_2 при культивировании первой генерации бруцелл, способности к образованию сероводорода, редуцирующей активности в отношении анилиновых красителей фуксина и тионина, уреазной активности, а также по наличию родоспецифичного гена *bcsp31* и отсутствию одного из видоспецифичных генов *BRA0420* (*B. abortus*), *BRA0907* (*B. melitensis*), *BMEI1426* (*B. canis*), *BMEI10711* (*B. neotomae*), *BMEI0994* (*B. ovis*). Для проведения молекулярно-генетического анализа использовали «Набор реагентов для выявления и дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза методом полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени «Бру-Диф-РГФ» (ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора), имеющий государственную регистрацию.

При постановке биопробы изучена способность исследуемых штаммов бруцелл распространяться в тканях и органах чувствительного макроорганизма (кровь, перитонеальный экссудат, лимфатические узлы, селезенка и печень).

Результаты исследования и их обсуждение

Штаммы рода *Brucella*, используемые для обеспечения практических занятий, должны быть максимально безопасными и обладать набором свойств, необходимых для индикации, идентификации и межвидовой дифференциации. В соответствии с нормативными и методическими документами по лабораторной диагностике бруцеллеза, учебными планами программ профессиональной переподготовки специалистов, действующими санитарными правилами и нормами по обеспечению биологической безопасности работ с патогенными биологическими агентами (ПБА) нами были составлены технические задания на штаммы рода *Brucella* с перечнем таксономических признаков (НМД по лаб. диагностике и СанПиН 3.3686-21). Было определено, что используемые в учебном наборе бруцеллы должны соответствовать следующим требованиям:

- авирулентность или сниженная вирулентность штаммов, выдаваемых слушателям курсов для проведения микробиологических манипуляций на практических занятиях. Показатель вирулентности возбудителя бруцеллеза – ИД_{50} – должна быть сопоставима с ИД_{50} вакцинного штамма *B. abortus* 19 BA: для белых мышей – от $5,0 \times 10^2$ до $5,0 \times 10^5$ м.к., для морских свинок – от $5,0 \times 10^2$ до $5,0 \times 10^4$ м.к. [9];

- наличие комплекса свойств, позволяющих изучить типичные морфологические, культуральные и физиолого-биохимические характеристики рода и видов бруцелл, провести индикацию и идентификацию регламентированными методами;

- наличие родоспецифических антигенов, выявляемых с помощью регламентированных иммунологических методов – МФА, РА;

- наличие комплекса свойств, позволяющих провести межвидовую дифференциацию бруцелл, включая потребность в присутствии 5–10% CO_2 при культивировании первой генерации штамма; интенсивность образования сероводорода; уреазную активность; редуцирующую активность в отношении анилиновых красителей (тионина, фуксина);

- наличие родоспецифичного гена *bcsp31* и отсутствие одного из видоспецифичных генов *BRA0420* (*B. abortus*), *BRA0907* (*B. melitensis*), *BMEI1426* (*B. canis*), *BMEI10711* (*B. neotomae*), *BMEI0994* (*B. ovis*), детекция которых осуществляется с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР);

- способность моделировать экспериментальную инфекцию у лабораторных животных и стабильно выделяться из паренхиматозных органов при посеве на плотные питательные среды.

Работу проводили поэтапно: 1) первичный отбор штаммов из фонда ГКПБ на основе паспортных данных; 2) оценка штаммов по вирулентности и диагностически значимым биологическим свойствам; 3) формирование учебного набора бруцелл и разработка рекомендаций по их использованию в образовательном процессе.

В результате анализа паспортных данных в соответствии с разработанными критериями нами были отобраны 9 штаммов: *B. melitensis* 16M; *B. abortus* C-68, *B. abortus* 544, *B. abortus* 19 BA; *B. suis* 40, *B. suis* 1330; *B. neotomae* 5K33; *B. ovis* 25-90; *B. canis* 1066.

Первоначально все штаммы – кандидаты в учебные были оценены по одному из основных критериев – вирулентности для белых мышей и морских свинок (табл. 1). Инфицирующая доза всех изученных штаммов, кроме *B. melitensis* 16M на мышях и морских свинках, а также *B. suis* 1330 на морских свинках, находилась в пределах, установленных для вакцинного [ФС.3.3.1.0011.15].

Отобранные штаммы были охарактеризованы с помощью регламентированных диагностических тестов (табл. 1).

Анализ полученных результатов позволил сделать следующий выбор для проведения практических занятий учебного модуля «Микробиология и лабораторная диагностика бруцеллеза»:

1) изучение морфологических и культуральных свойств возбудителей бруцеллеза – *B. abortus* 19 BA, *B. melitensis* M-16, *B. ovis* 25-90 и *B. neotomae* 5K33. Для изучения морфологии клеток возбудителей бруцеллеза на практических занятиях используют вакцинный штамм *B. abortus* 19 BA, обладающий тинкториальными (окраска по Граму) и морфологическими характеристиками клетки, типичными для всех представителей рода *Brucella*. Кроме того, важной характеристикой вида бруцелл является оценка культуральных свойств. Характерными признаками роста возбудителей бруцеллеза на питательной среде являются медленный рост в S- или R-формах. Использование штамма *B. abortus* 19 BA позволяет изучить морфологию S-формы роста бруцелл, характеризующуюся формированием на агаре бесцветных, диаметром 0,5–2 мм, гомогенных, выпуклых колоний с гладкой поверхностью и ровным краем, а в бульоне – гомогенным помутнением.

Использование штамма *B. melitensis* 16 M позволяет изучить особенности роста наиболее вирулентного для человека вида бруцелл, колонии которого растут в S-форме, но отличаются очень небольшим (диаметр 0,1–0,3 мм) размером, в 5 и более раз меньше колоний *B. abortus* 19 BA.

Штаммы *B. ovis* 25-90 и *B. neotomae* 5K33 позволяют изучить морфологию R-формы роста бруцелл, характеризующуюся формированием на агаре мутных колоний с зерни-

Таблица. 1. Диагностически значимые свойства штаммов бруцелл – кандидатов в учебные
 Table 1. Diagnostically significant properties of *Brucella* strains – candidates for training

Наименование / Name		ИД50, м.к. / ID50, mc		Тинкто- риальные свойства / Tinctorial properties	Рост на питательной среде / Growth on the nutrient medium		проба Уайт– Вильсона / White–Wilson test	РА с поливалентной сывороткой / RA with polyvalent serum	МФА / DFA (Direct fluorescent antibody)
вид / variety	штамм / strain	белые мыши / white mice	морские свинки / Guinea pigs		на плотной (размер колоний, мм) / on the dense (colony size, mm)	в жидкой / in the liquid			
<i>B. melitensis</i>	16M	9,7	$2,7 \times 10^6$	Грам- / Gram-	0,1–0,3	бульон полупрозрачный (легкое равномерное помутнение), пристеночное кольцо, осадок / translucent broth (slight uniform turbidity), parietal ring, sediment	неокрашенные / S-форма / unpainted/ S-shape	+++	нет данных / no data
<i>B. abortus</i>	19 BA	$1,4 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$	-«-	0,2–0,3	равномерное помутнение, пристеночное кольцо, осадок / uniform turbidity, parietal ring, sediment	-«-	+++	++++
	C-68	$3,0 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	-«-	0,2–0,3	небольшие фрагменты кольца, прозрачный бульон, плохо разбивающийся осадок / small fragments of the ring, clear broth, hard to break sediment	-«-	++++	+++
	544	$1,0 \times 10^5$	$5,9 \times 10^3$	-«-	0,1–0,2	равномерное помутнение, пристеночное кольцо, плохо разбивающийся осадок / uniform turbidity, parietal ring, poorly breaking sediment	-«-	++++	нет данных / no data
<i>B. suis</i>	40	$1,1 \times 10^3$	$1,9 \times 10^4$	-«-	0,1–0,2	прозрачный бульон, осадок / clear broth, sediment	-«-	++	+++
	1330	$9,1 \times 10^4$	$5,9 \times 10^4$	-«-	0,2–0,3	равномерное помутнение, пристеночное кольцо, осадок, плохо разбивающиеся тяжи / uniform turbidity, parietal ring, sediment, poorly broken strands	-«-	++++	++++
<i>B. neotomae</i>	5K33	$3,4 \times 10^4$	$2,6 \times 10^3$	-«-	0,2–0,9	прозрачный бульон, плохо разбивающийся осадок / clear broth, hard to break sediment	Около 70% колоний синего цвета/ R-форма / R-forma About 70% of the colonies are blue/ R-shape	+++	++++
<i>B. ovis</i>	25–90	$1,3 \times 10^5$	нет данных / no data	-«-	0,1–0,3	нет данных / no data	R-форма / R-forma	нет данных / no data	нет данных / no data
<i>B. canis</i>	1066	$4,0 \times 10^5$	нет данных / no data	-«-	0,2–0,3	нет данных / no data	нет данных / no data	нет данных / no data	нет данных / no data

стой или слизистой поверхностью, неровным краем, а в бульоне – появлением хлопьев и осадка на фоне прозрачной среды;

2) иммунологические методы в схеме лабораторной диагностики бруцеллеза (МФА, РА) – *B. abortus* 19 BA, *B. suis* 1330, *B. neotomae* 5K33.

Вследствие трудностей, связанных с выделением культуры бруцелл и длительностью культивирования возбудителей,

иммунологические методы занимают одно из ведущих мест в комплексе основных методов индикации. Широко используют МФА и РА.

Результаты МФА со штамма *B. abortus* 19 BA, *B. suis* 1330 и *B. neotomae* 5K33 оценивают как специфическое свечение с яркостью 4 креста – яркая флуоресценция желто-зеленого цвета оболочки микробной клетки, четко контрастируемая с темным телом клетки.

Таблица. 2. Межвидовая дифференциация штаммов бруцелл – кандидатов в учебные
Table. 2. Interspecific differentiation of *Brucella* strains – candidates for training

Наименование / Name вид / variety	штамм / strain	Культивирование первой генерации / Cultivation of the first generation		Образование H ₂ S, мм / H ₂ S formation, mm	Редукция анилиновых красителей / Reduction of aniline dyes		Уреазная активность / Urease activity
		доступ воздуха / air access	избыток CO ₂ / excess CO ₂		фуксин / magenta	тионин / thionine	
<i>B. melitensis</i>	16M	+	+	-	+	+	в течение 1 ч / during 1 hour
<i>B. abortus</i>	19 BA	-	+	6	+	-	-«-
	C-68	+	+	5	+	+	-«-
	544	+	+	-	+	-	-
<i>B. suis</i>	40	+	+	-	+	+	в течение 5 мин / during 5 minutes
	1330	+	+	14	-	+	-«-
<i>B. neotomae</i>	5k33	+	+	-	-	-	+

При постановке РА с препаратом «Сыворотка диагностическая поливалентная бруцеллезная сухая для реакции агглютинации» штаммы *B. abortus* C 68, *B. abortus* 544, *B. suis* 1330 демонстрируют результат, оцениваемый как 4+ – через 2–3 мин формируются крупные или мелкие хлопья на фоне прозрачной среды; штаммы *B. melitensis* 16 M, *B. abortus* 19 BA, *B. neotomae* 5K33 – результат, оцениваемый как 3+: через 2–3 мин формируются крупные или мелкие хлопья на фоне не полностью просветлевшей среды. Данные результаты являются положительными и свидетельствуют о принадлежности штаммов к роду *Brucella*;

3) изучение диссоциации бруцелл – *B. abortus* 19 BA, *B. ovis* 25-90, *B. neotomae* 5K33.

Для проведения идентификации и межвидовой дифференциации бруцелл регламентировано использовать культуру, находящуюся в S-форме. Поэтому первым этапом идентификации является оценка диссоциации выделенной культуры – степени перехода из S- в R-форму роста.

Одна из методик определения степени диссоциации культур – проба Уайт-Вильсона, при постановке которой диссоциированные колонии окрашиваются кристаллическим фиолетовым от темно-фиолетового до светло-синего цвета, а недиссоциированные, находящиеся в S-форме, остаются неокрашенными. Для изучения роста культуры преимущественно в S-форме используют вакцинный штамм *B. abortus* 19 BA, в R-форме – *B. ovis* 25-90, *B. neotomae* 5K33.

Изучение признаков, регламентированных для межвидовой дифференциации бруцелл, позволило определить группу штаммов для обеспечения практических занятий (табл. 2).

4) освоение межвидовой дифференциации бруцелл, наиболее патогенных для человека – *B. abortus* 19 BA, *B. abortus* C-68, *B. suis* 1330, *B. melitensis* M-16.

Для изучения признаков вида *B. abortus* используют вакцинный штамм *B. abortus* 19 BA биовар 1, обладающий типичными характеристиками: культивирование первой генерации в атмосфере повышенного содержания CO₂ (+), образование сероводорода (+, суммарно 6 мм), рост на среде с тионином (-), с фуксином (+), гидролиз мочевины (уреазная активность) в течение 1 ч после посева.

Для изучения признаков вида *B. suis* используют штамм *B. suis* 1330 биовар 1, обладающий типичными характеристиками: культивирование первой генерации в атмосфере

повышенного содержания CO₂ (-), образования сероводорода (+, суммарно 14 мм), рост на среде с тионином (+), с фуксином (-), гидролиз мочевины (уреазная активность) в течение 5 мин после посева.

Признаки наиболее патогенного вида – *B. melitensis* – демонстрируют на примере штамма *B. melitensis* 16M, обладающего типичными характеристиками: культивирование первой генерации в атмосфере повышенного содержания CO₂ (-), образования сероводорода (-), рост на среде с тионином (+), с фуксином (+), гидролиз мочевины (уреазная активность) в течение 1 ч после посева;

5) для проведения практического занятия «ПЦР в схеме лабораторной диагностики бруцеллеза» целесообразно использовать штаммы 6 видов – *B. abortus* 19 BA, *B. melitensis* 16 M, *B. suis* 1330, *B. ovis* 25-90, *B. canis* 1066, *B. neotomae* 5K33.

В схеме лабораторной диагностики исследование с помощью ПЦР регламентировано как на этапе индикации при исследовании биологического материала и объектов окружающей среды, так и при идентификации выделенных культур и межвидовой дифференциации штаммов *Brucella* ssp.

Нами с помощью набора реагентов «Бру-Диф-РГФ» было исследовано наличие родо- и видоспецифичных генетических маркеров у штаммов бруцелл – кандидатов в учебные. Показано наличие у всех штаммов родоспецифичного фрагмента bcsp31 и соответствующих видоспецифичных генов:

- *B. abortus* 19 BA – BRA0907 (+), BRA0420 (-), BMEI1426 (+), BMEI0711 (+), BMEI0994 (+);

- *B. melitensis* 16 M – BRA0907 (-), BRA0420 (+), BMEI1426 (+), BMEI0711 (+), BMEI0994 (+);

- *B. suis* 1330 – BRA0907 (+), BRA0420 (+), BMEI1426 (+), BMEI0711 (+), BMEI0994 (+);

- *B. ovis* 25-90 – BRA0907 (+), BRA0420 (+), BMEI1426 (+), BMEI0711 (+), BMEI0994 (-);

- *B. canis* 1066 – BRA0907 (+), BRA0420 (+), BMEI1426 (-), BMEI0711 (+), BMEI0994 (+);

- *B. neotomae* 5k33 – BRA0907 (+), BRA0420 (+), BMEI1426 (+), BMEI0711 (-), BMEI0994 (+);

6) освоение биологического метода лабораторной диагностики бруцеллеза в рамках занятия «Лабораторная диагностика бруцеллеза у людей» – *B. abortus* 19 BA, *B. abortus* C-68.

Таблица. 3. Обсемененность органов и тканей белых мышей, инфицированных штаммами бруцелл – кандидатами в учебные
 Tab. 3. Contamination of organs and tissues of white mice infected with strains of *Brucella* – candidates for training

Наименование / Name		Интенсивность* роста культуры на плотных питательных средах из / Intensity* of culture growth on dense nutrient media from							Морфология колоний, размер / Morphology of colonies, size		Рост в бульоне / growth in broth		
вид / variety	штамм / strain	перитонеальный / peritoneal экссудат / peritoneal	печень / liver	кровь / blood	лимфатические узлы / the lymph nodes	легкие / lungs	селезенка / spleen				печень / liver	селезенка / spleen	кровь / blood
<i>B. melitensis</i>	16M	+++	++	+	+	+	-	колонии бесцветные, выпуклые с гладкой поверхностью, гомогенные, по мере старения культуры становятся белесоватыми, d = 0,5–0,7 мм / colonies are colorless, convex with a smooth surface, homogeneous, as the cultures become whitish as they age, d = 0,5–0,7 mm			+	+	+
<i>B. abortus</i>	19 BA	+	+	-	-	-	+	-«-», d ≈ 0,5 мм, слизистые / ≈ 0.5 mm, mucous			+	+	+
	C-68	+	+++	+++	+	+	+++	-«-»			+	+	+
	544	++	+	++	++	++	+	-«-», d = 0,5–0,7 мм			+	+	+
<i>B. suis</i>	40	+	++	+/-	+	+	++	-«-», d = 0,3–0,5 мм			+	+	+
	1330	+	+	+/-	+	+	++	-«-», d ≈ 1,0 мм			+	+	+
<i>B. neotomae</i>	5k33	+	++	+	+	+	+++	-«-», d = 0,7–1,0 мм			+	+	+

* +++ – очень интенсивный рост; ++ – интенсивный рост; + – единичные колонии.
 * +++ - very intensive growth; ++ – intensive growth; + – single colonies.

В схеме лабораторной диагностики бруцеллеза биологический метод является обязательным на этапе индикации с целью накопления бактериальной культуры в органах лабораторных животных и повышения вероятности выделения ее при посеве на питательные среды. Часто бруцеллы можно выделить только с использованием биологического метода.

При заражении вирулентными штаммами бруцелл лабораторные животные заболевают, но не погибают. При вскрытии после эвтаназии отмечают отсутствие каких-либо характерных для бруцеллеза патоморфологических изменений внутренних органов. При посеве фрагментов паренхиматозных органов (печень, селезенка, лимфоузел) и крови на питательные среды выделяют культуру возбудителей бруцеллеза. С целью выбора штаммов бруцелл для проведения практического занятия по освоению биологического метода лабораторной диагностики нами была оценена обсемененность органов и тканей белых мышей, инфицированных исследуемыми штаммами (табл. 3). Обобщение полученных данных позволило предложить использовать для практического занятия два штамма.

Штамм *B. abortus* C-68 применяют преподаватели для демонстрации методики заражения и вскрытия лабораторных животных. При подкожном заражении и последующих посевах на плотные питательные среды отмечено равномерное и интенсивное распространение по органам, особо обильный рост типичных колоний бруцелл наблюдали из отпечатков печени, селезенки и крови.

Однако манипуляции при заражении и вскрытии лабораторных животных относят к процедурам с высоким риском инфицирования, и это определяет целесообразность ис-

пользования обучающимися для проведения работы авирулентного вакцинного штамма *B. abortus* 19 BA, несмотря на рост единичных колоний бруцелл при посеве селезенки, печени и перитонеального экссудата на питательные среды.

Согласно рекомендациям референс-центра по мониторингу за бруцеллезом (ФКУЗ «Ставропольский НИПЧИ» Роспотребнадзора) и для снижения вероятности лабораторного инфицирования обучающихся предложен дифференцированный порядок применения штаммов учебного набора на практических занятиях. Непосредственная работа слушателей курсов профессиональной переподготовки, в т.ч. отработка навыков вскрытия лабораторных животных при освоении биологического метода диагностики, сопряжена с вакцинным штаммом *B. abortus* 19 BA. Подготовку культур *B. abortus* C-68, *B. suis* 1330, *B. melitensis* 16M, *B. neotomae* 5k33, *B. ovnis* 25-90, *B. canis* 1066 для демонстрации отличающихся от вакцинного штамма морфологических, культуральных, антигенных свойств, изменчивости (диссоциации S- и R-форм), интенсивности образования сероводорода, редуцирующей активности в отношении анилиновых красителей (фуксина и тионина), уреазной активности, а также подготовку проб – имитаторов ПБА, выделение ДНК и приготовление стандартных учебных образцов для ПЦР-анализа проводят преподаватели, имеющие допуск к работе с ПБА II группы.

При подготовке проб, имитирующих содержимое гигромы (бурсы, абсцесса), шерсть, молоко/молочные продукты, мокроту, почву, воду из открытого водоема, смыв с поверхности, подстилочный материал, фураж, целесообразно наряду с бруцеллами включать «фоновые» микроорганизмы. С этой целью учебный набор дополнен *Escherichia coli* ATCC 25922,

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* 209P (ATCC 6538), *Klebsiella pneumoniae* 8172, *Bacillus cereus* 504-го типа (ATCC 14579).

Таким образом, на основании проведенных исследований сформирован учебный набор штаммов бактерий, который позволяет при профессиональной переподготовке в полном объеме освоить регламентированные методы индикации, идентификации и дифференциации бруцелл, на вакцинном штамме приобрести навыки манипуляций с ПБА II группы с соблюдением правил биобезопасности, снизив вероятность лабораторного инфицирования. Учебный набор в целом или частично может быть применен для обеспечения практических занятий на курсах повышения квалификации.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Бруцеллез (руководство для врачей). Под ред. проф. Вершиловой ПА. М., 1961.
2. Пономаренко ДГ, Скударева ОН, Хачатурова АА, Лукашевич ДЕ, Жаринова ИВ, Даурова АВ, и др. Бруцеллез: тенденции развития ситуации в мире и прогноз на 2022 г. в Российской Федерации. Проблемы особо опасных инфекций. 2022;2:36-45. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-36-45
3. Основы государственной политики Российской Федерации в области обеспечения химической и биологической безопасности на период до 2025 года и дальнейшую перспективу: Указ Президента Российской Федерации от 11 марта 2019 г. №97.
4. Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза: методические указания МУК 3.1.7.3402-16.
5. Идентификация и типирование штаммов бруцелл с использованием молекулярно-биологических методов: методические рекомендации МР 3.1.0288-22.
6. Профилактика бруцеллеза: санитарные правила и нормы СанПиН 3.3686-21 (глава XIII).
7. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней: методические указания МУК 4.2.3010-12.
8. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Под ред. акад. Кутырева ВВ. Изд. 2-е, перераб. и доп. М.: ЗАО Шико, 2013.
9. Вакцина бруцеллезная живая: фармакопейная статья ФС.3.3.1.0011.15.

References

1. Brucellosis (guidelines for doctors). Pod red. prof. Vershilovoi PA. M., 1961. (In Russian).

2. Ponomarenko DG, Skudareva ON, Khachaturova AA, Lukashevich DE, Zharinova IV, Daurova AV, et al. Brucellosis: Trends in the Development of Situation in the World and Forecast for 2022 in the Russian Federation. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2022;2:36-45. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-36-45 (In Russian).
3. Osnovy gosudarstvennoi politiki Rossiiskoi Federatsii v oblasti obespecheniya khimicheskoi i biologicheskoi bezopasnosti na period do 2025 goda i dal'neishuyu perspektivu: Ukaz Prezidenta Rossiiskoi Federatsii ot 11 marta 2019 g. №97. (In Russian).
4. Epidemiologicheskii nadzor i laboratornaya diagnostika brutselleza: metodicheskie ukazaniya MUK 3.1.7.3402-16. (In Russian).
5. Identifikatsiya i tipirovanie shtammov brutsell s ispol'zovaniem molekulyarno-biologicheskikh metodov: metodicheskie rekomendatsii MR 3.1.0288-22. (In Russian).
6. Profilaktika brutselleza: sanitarnye pravila i normy SanPiN 3.3686-21 (glava XIII). (In Russian).
7. Poryadok organizatsii i provedeniya laboratornoi diagnostiki brutselleza dlya laboratorii territorial'nogo, regional'nogo i federal'nogo urovnei: metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.3010-12. (In Russian).
8. Laboratornaya diagnostika opasnykh infektsionnykh boleznei. Prakticheskoe rukovodstvo. Pod red. akad. Kutyreva VV. Izd. 2-e, pererab. i dop. M.: ZAO Shiko, 2013. (In Russian).
9. Vaksina brutselleznaya zhivaya: farmakopeinaya stat'ya FS.3.3.1.0011.15. (In Russian).

Информация о соавторах:

Малюкова Татьяна Анатольевна, кандидат медицинских наук, и.о. заведующего отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Чеховская Галина Викторовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Осина Наталия Александровна, кандидат биологических наук, заведующая отделом микробиологии ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Германчук Валерий Геннадьевич, доктор медицинских наук, заведующий отделом экспериментальных животных с виварием ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Попов Юрий Алексеевич, доктор биологических наук, главный научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Tatyana A. Malyukova, PhD in Biological Sciences, Acting Head, Department of Educational Programs and Training of Specialists, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rosпотребнадзор

Galina V. Chekhovskaya, PhD, MD, Senior Researcher, Department of Educational Programs and Training of Specialists, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rosпотребнадзор

Natalia A. Osina, PhD in Biological Sciences, Head, Department of Microbiology, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rosпотребнадзор

Valery G. Germanchuk, MD, PhD, DSc, Head, Department of Experimental Animals with a Vivarium, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rosпотребнадзор

Yury A. Popov, PhD, DSc in Biological Sciences, Chief Researcher, Department of Educational Programs and Specialist Training, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rosпотребнадзор

Доклинические испытания безопасности применения и иммуногенности брюшнотифозной молекулярной вакцины

А.И.Маматкулов¹, П.Е.Игнатов²

¹Ташкентский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток, Ташкент, Республика Узбекистан;

²IGN-International, Лос-Анджелес, США

Статья посвящена разработке и использованию в практических условиях медицины инновационного направления для борьбы с брюшным тифом, а именно: профилактики болезни посредством санации хронического брюшнотифозного бактерионосительства и вакцинации подлежащего контингента брюшнотифозной молекулярной вакциной жидкой. При этом ликвидируется возможность передачи этого заболевания людям от хронических бактерионосителей. Новизна этого исследования заключается в конструировании вакцины двойного назначения как для профилактики, так и для специфической санации (лечения) хронического брюшнотифозного бактерионосительства. На основании этого изучения были разработаны лечебно-профилактическая вакцина и программа борьбы с брюшным тифом, проведено доклиническое испытание этой вакцины на лабораторных животных.

Ключевые слова: брюшной тиф, бактерионоситель, вакцина, адъювант, хронический носитель

Для цитирования: Маматкулов А.И., Игнатов П.Е. Доклинические испытания безопасности применения и иммуногенности брюшнотифозной молекулярной вакцины. Бактериология. 2023; 8(2): 56–59. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-56-59

Safety of the typhoid molecular vaccine

A.I.Mamatkulov¹, P.E.Ignatov²

¹Tashkent Research Institute of Vaccines and Serums, Tashkent, Republic of Uzbekistan;

²IGN-International, Los Angeles, USA

The work is devoted to the development and use in practical medical conditions of an innovative direction for the fight against typhoid fever, namely: the prevention of the disease through the rehabilitation of chronic typhoid bacteriocarrier and vaccination of the subject contingent with typhoid molecular vaccine liquid. At the same time, the possibility of transmitting this disease to people from chronic bacteria carriers is eliminated. The novelty of this study lies in the construction of a dual-use vaccine for both prevention and specific sanitation (treatment) of chronic typhoid bacteriocarrier. Based on this study, a therapeutic vaccine and a typhoid control program were developed; preclinical testing of this vaccine in laboratory animals.

Key words: typhoid fever, bacteria carrier, vaccine, adjuvant, chronic carrier

For citation: Mamatkulov A.I., Ignatov P.E. Safety of the typhoid molecular vaccine. Bacteriology. 2023; 8(2): 56-59. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-56-59

Проблема брюшного тифа остается одной из наиболее актуальных в инфекционной патологии. Как указывают отдельные авторы, уровень заболеваемости брюшным тифом во многих государствах, в том числе и в странах СНГ, практически не снижается. Эпидемия брюшного тифа в Таджикистане в 1996–1998 гг., получившая название супер-эпидемии, характеризовалась мультилекарственной устойчивостью возбудителя и охватом широких слоев населения. Только в 1996 г. в Республике Таджикистан было зарегистрировано более 10 тыс. случаев брюшного тифа с тяжелым и осложненным течением.

Благодаря крупным социально-экономическим и культурным преобразованиям заболеваемость брюшным тифом в цивилизованных странах (США, Франция, Англия, Германия и др.) за последнее десятилетие неуклонно снижалась и в настоящее время в большинстве регионов стран СНГ, кроме Таджикистана и Кыргызстана, регистрируется как спорадическая. Это обстоятельство вместе с утвердившимся пред-

Для корреспонденции:

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

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

Статья поступила 20.03.2023, принята к печати 30.06.2023

For correspondence:

Alisher I. Mamatkulov, Director of JV LLC «BIBINOR», Junior Researcher, Tashkent Research Institute of Vaccines and Serums

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

The article was received 20.03.2023, accepted for publication 30.06.2023

ставлением о более легком течении современного брюшного тифа, наряду с резким снижением смертности от него, может привести к выводу о том, что эта болезнь перестала быть проблемой как в эпидемиологическом, так и в клинικο-терапевтическом отношении. Однако подобный вывод был бы преждевременным и неверным. Регистрируемый на территории Таджикистана с 1992 г. и на территории Узбекистана с 1996 г. новый вариант *Salmonella enterica* серотип *Typhi*, устойчивый к ампициллину, левомицетину, тетрациклину *S. Typhi* 61-01 антибиотиковаар, вызывает более тяжелое течение брюшного тифа с тяжелейшими осложнениями, такими как инфекционно-токсический шок, кровотечение, перфорация, тенденция к более выраженному формированию бактерионосительства, чем штаммы, чувствительные к этим антибиотикам.

До настоящего времени проблема заболеваемости брюшным тифом остается нерешенной из-за отсутствия эффективных препаратов, необходимых для нейтрализации основных источников возбудителя инфекции – хронических бактерионосителей. Бактерионосители являются основными источниками инфекции как при водных, так и при пищевых и спорадических случаях заражения брюшным тифом с различными клиническими проявлениями. Одной из самых крупных «водных» эпидемий за последние 25 лет была эпидемия брюшного тифа в Таджикистане, где в 1996–1997 гг. было официально зарегистрировано 29 382 заболевших брюшным тифом, из которых 10 526 (38%) случаев приходилось на г. Душанбе. Обращает на себя внимание, что в этой вспышке более чем у половины переболевших формировалось хроническое носительство по причине приобретения резистентности к этиотропному препарату для лечения (хлорамфеникол, левомицетин), предложенному Всемирной организацией здравоохранения [1].

Для профилактики брюшного тифа используют различные иммунобиологические препараты, но вакцин, предназначенных как для санации хронических носителей, так и для профилактики брюшного тифа, т.е. вакцинных препаратов двойного действия, в мире не существует.

В Научно-исследовательском институте эпидемиологии, микробиологии и инфекционных заболеваний при Министерстве здравоохранения Республики Узбекистан (НИИЭМИЗ МЗ РУз, ныне РСНПМЦИПЗ) совместно с СП ООО Bibinor была разработана отечественная брюшнотифозная молекулярная вакцина жидкая (БМВ). На основании Временной фармакопейной статьи (ВФС) вакцина предназначена для санации хронического брюшнотифозного бактерионосительства и профилактики заболевания. Препарат зарегистрирован в Главном управлении по контролю качества лекарственных средств и медицинской техники 16 октября 2006 г. за №004-06 и разрешен к клиническому применению приказом Министерства здравоохранения №440 от 16 октября 2006 г.

Вакцина с профилактической целью вводится в дозе 0,5 мл, а с лечебной целью для санации хронических носителей возбудителей брюшного тифа – 1,5 мл по схеме. Способ введения – внутримышечно. Препарат запатентован [2].

Целью настоящей работы является описание результатов доклинических испытаний БМВ – Vi-антигенной вакцины на основе производственного штамма *S. Typhi*.

Материалы и методы

Клинико-лабораторные, микробиологические исследования проводились в лаборатории молекулярной эпидемиологии и специфической профилактики инфекционных заболеваний НИИЭМИЗ МЗ РУз.

Для проведения лабораторно-микробиологического скрининга использованы гемокультуры, выделенные в Самаркандской и Наманганской областях, в сравнении с культурами из Национальной коллекции микроорганизмов.

Биологические свойства вакцинного штамма сравнили с 25 штаммами возбудителя брюшного тифа, выделенными от больных в возрасте 16–55 лет с различными клиническими формами брюшного тифа, подтвержденного бактериологическими и серологическими методами.

Доклинические испытания БМВ по изучению специфической безвредности и иммуногенности проводили на 4 морских свинках и 108 нелинейных белых мышах смешанного поголовья массой 15 ± 1 г.

Курс лечения (санации) проведен на 106 больных – хронических носителей брюшного тифа, контрольную группу составили 35 носителей.

В работе использовались микробиологические и лабораторные методы исследования: кристаллографический, серологический и бактериологический. Содержание специфических противобрюшнотифозных Vi-антител определяли в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) микрометодом на аппарате «Такачи» набором реагентов «Диагностикум эритроцитарный сальмонеллезный Vi-антигенный жидкий для РПГА» (ФГУН «НИИЭМ им. Пастера» Роспотребнадзора, Российская Федерация). При наличии антител к возбудителю брюшного тифа наблюдалась гемагглютинация sensibilizированных Vi-антигеном куриных эритроцитов, что приводило к образованию на дне U-образных лунок планшета «зонтика» из осевших эритроцитов. При отсутствии антител к возбудителю брюшного тифа осевшие эритроциты образовывали «точку».

Специфическую безвредность определяли по методике, изложенной в ФС 42Уз-0130BC-2004. Иммуногенность препарата, содержащего в 1 мл 0,2 мг брюшнотифозного антигена, определяли параллельно в сравнении с отраслевым стандартным образцом (ОСО) иммуногенности на нелинейных белых мышах. Вакцину разводили 0,85%-м раствором натрия хлорида так, чтобы в 0,5 мл содержались уменьшающиеся количества антигена (0,025; 0,0025; 0,00025; 0,000025 мг). По 0,5 мл каждого разведения вводили 18 мышам подкожно в область спины. Через 10–12 дней иммунизированных мышей (по 8 в каждой группе) заражали внутривнутрибрюшинно в дозе 2 LD₅₀ тест-культурой брюшного тифа в объеме 0,5 мл. Контроль – 18 мышей. Дозу заражения устанавливали предварительно за 3–4 дня перед заражением опытных животных и повторно в день заражения на одной и той же партии мышей, которые были взяты для иммунизации. 16–18-часовую тест-культуру брюшного тифа смывали 0,85%-м раствором натрия хлорида с агара Хоттингера, доводили ее мутность до 10 ед. по ОСО мутности 42-59-85 (мутность ОСО в 10 ед. эквивалента составляет 0,85 млрд микробных клеток). Для заражения полученную

Таблица. **Определение иммуногенности вакцины БМВ в эксперименте на белых мышах**
Table. **Determination of the immunogenicity of the typhoid molecular vaccine (TMV)vaccine in an experiment on white mice**

	1-я группа / Group 1		2-я группа / Group 2		3-я группа / Group 3		4-я группа / Group 4		5-я группа / Group 5		Контроль / Control	
Мышей / Mice	18		18		18		18		18		18	
Доза вакцины / Vaccine	Субстанция		1:10		1:100		1:1000		1:10000			
	10 ⁰		10 ¹		10 ²		10 ³		10 ⁴			
Заражающая доза / Infecting dose	10 ⁶ –10 ⁷		10 ⁶ –10 ⁷		10 ⁶ –10 ⁷		10 ⁶ –10 ⁷		10 ⁶ –10 ⁷		10 ⁶ –10 ⁷	
В день наблюдения / At the day of observation	Выжило / Survived	Погибло / Died	Выжило / Survived	Погибло / Died	Выжило / Survived	Погибло / Died	Выжило / Survived	Погибло / Died	Выжило / Survived	Погибло / Died	Выжило / Survived	Погибло / Died
1-й день	18	0	18	0	18	0	15	3	13	5	8	10
2-й день	18	0	18	0	18	0	14	1	9	4	3	5
3-й день	18	0	18	0	18	0	13	1	7	2	0	3
Итого	18	0	18	0	18	0	13	5	7	11	0	18
Выживаемость, % / Survival	100		100		100		72,2		38,8		0	

взвесь разводили до 110 ± 30 млн микробных клеток в объеме 0,5 мл. Для определения LD₅₀ тест-культуру разводили двукратно, чтобы получить не менее 4 доз. Опытным и контрольным мышам внутрибрюшинно вводили по 0,5 мл соответствующей дозы тест-культуры.

Результаты и обсуждение

Доклинические испытания вакцины проводились по инновационному проекту на основании Государственного заказа ИСС-2012-6-18 «Вакцина, предназначенная для профилактики заболевания брюшным тифом и санации хронического брюшнотифозного бактерионосительства».

На первый год, согласно техническому заданию, была запланирована наработка определенного количества препарата с изучением специфической безвредности и иммуногенности на основании ВФС на лабораторных животных.

Результаты иммунизации мышей представлены в таблице.

Наблюдение за животными в течение 3 дней показало, что в первых 3 экспериментальных группах отмечались идентичные результаты, несмотря на то, что животным 2-й и 3-й группы была введена разбавленная в 10 и 100 раз вакцина. Следовательно, у мышей этих групп были в достаточной степени выработаны антитела. Из мышей 4-й группы только у 13 был выработан иммунитет, т.к. 5 из них погибли уже в первые 2 дня эксперимента. Разведение вакцины в 4 раза оказалось еще менее эффективным, что доказывается гибелью мышей: в 1-е сутки – 5, во 2-е – 4, в 3-и – еще 2 мыши. К концу исследуемого периода осталось 7 мышей, что составило 38,8%. В контрольной группе мышей, не получавших вакцину, погибли все 18 (100%) грызунов.

Следующим этапом было исследование местнораздражающего действия выбранной дозы.

Морским свинкам массой 300–350 г препарат вводили подкожно по 2,5 мл в каждый бок. Наблюдение за животными вели ежедневно в течение 7 дней. Ни у одного животного на месте введения вакцины не образовалось уплотнение, не развился абсцесс или некроз. В целях исследования содержания Vi-антигена животные содержались до 14 дней.

Далее изучали специфическую безвредность вакцины. Морским свинкам вводили по 5 мл вакцины БМВ (по 2,5 мл в каждый бок). После инъекций на каждом боку морских

свинок изучали наличие местной температуры, аллергической реакции и наличие воспалительной реакции на месте введения вакцины.



Рисунок. **Результаты РПНА.**

Ряды лунок: 1 – положительный контроль сыворотки; 2 – отрицательный контроль сыворотки; 3 – сыворотки крови контрольной группы невакцинированных мышей; 4 – сыворотки крови вакцинированных субстанцией вакцины; 5 – сыворотки крови вакцинированных мышей в разведении 1:10; 6–8 – сыворотки крови мышей, вакцинированных в разведении 1:100, 1:1000, 1:10000 соответственно; 9 – сыворотка крови морской свинки – специфическая безвредность; 10 – сыворотки крови иммунизированных мышей в разведении 1:10 000 после заражения вирулентной культурой; 11 – сыворотки крови иммунизированных мышей в разведении 1:1000 после заражения вирулентной культурой; 12 – сыворотки крови иммунизированных мышей в разведении 1:100 после заражения вирулентной культурой; 13 – сыворотки крови иммунизированных мышей в разведении 1:10 после заражения вирулентной культурой; 14 – сыворотки крови мышей, иммунизированных субстанцией вакцины после заражения вирулентной культурой; 8-я лунка 3–14-го рядов – контрольная (физиоствор).

Figure. **Results of passive hemagglutination reaction.**

Note: *Rows of holes: 1 – positive serum control, 2 – negative serum control, 3 – blood serum of the control group of unvaccinated mice, 4 – blood serum vaccinated with the vaccine substance, 5 – blood serum of vaccinated mice in dilution 1:10, 6 – blood serum of vaccinated mice in dilution 1:100, 7 – 1:1000, 8 – 1:10000, 9 – guinea pig blood serum – specific harmlessness, 10 – blood serum of immunized mice in a dilution of 1:10000 after infection with a virulent culture, 11 – blood serum of immunized mice in dilution 1:1000 after infection with a virulent culture, 12 – blood serum of immunized mice in dilution 1:100 after infection with a virulent culture, 13 – blood serum of immunized mice in a dilution of 1:10 after infection with a virulent culture, 14 – blood serum of immunized mice with a vaccine substance after infection with a virulent culture, 8 hole 3 – 14 rows of control (saline).

Результаты по определению иммуногенности и титра Vi-антител, образованных после иммунизации животных, отражены на рисунке.

Как видно из рисунка, контроли не вызывают сомнений, так как положительный контроль сыворотки определил титр 1:2560, а отрицательный контроль во всех разведениях был отрицательным, как и полученный отрицательный результат в 3-м ряде лунок с сыворотками крови невакцинированных контрольных мышей. В 4-м ряду лунок с сыворотками вакцинированных мышей субстанцией вакцины определился титр 1:640; в 5-м ряду с сыворотками иммунизированных мышей в разведении 1:10 также определился титр 1:640; в 6-м ряду с сыворотками крови иммунизированных мышей в разведении 1:100 выявился более высокий титр, равный 1:1280; в 7-м (разведение вакцины 1:1000) – 1:640; 8-й – в сыворотке крови иммунизированных мышей в разведении вакцины 1:10000 был выявлен самый низкий титр антител, равный 1:20; 9-й – в сыворотке крови МС – 1:80. С 10-го ряда лунок исключаются сыворотки крови иммунизированных мышей после их заражения вирулентной культурой брюшного тифа. Полученный титр 1:640 в 10-м ряду, при сравнении с результатом титра 1:20 при разведении вакцины 1:10000, можно объяснить тем, что при заражении возник результат вторичной иммунизации в более высоком количестве антигена. Результаты, полученные в рядах лунок 11 после заражения и 7 – до заражения (при разведении вакцины 1:1000), равный идентичному титру 1:640, указывают на хорошую иммуногенность вакцины, а результаты, полученные в рядах лунок 12 (1:1280) и 6 (1:1280) после и до заражения соответственно, – на высокую иммуногенность вакцины при разведении 1:100. Полученные титры при вакцинации мышей в разведении вакцины 1:10 и субстанцией вакцины (13-й и 14-й ряды лунок), равные 1:640, и после заражения вирулентной культурой, равные 1:320 и 1:1280 соответственно, являются подтверждением неиммуногенности выбранных концентраций антигена вакцины.

Проведенные доклинические исследования субстанции и вакцины БМВ в соответствии с общепринятыми рекомендациями и инструкциями показали следующее: вакцина БМВ обладает защитным эффектом в разведении 1:30 при внутрибрюшинном заражении лабораторных животных 2 LD₅₀ штаммом *S. Typhi*. Опыт по местнораздражающему действию при подкожном введении вакцины БМВ морским

свинкам в рабочей концентрации 1:30 показал отсутствие местнораздражающего действия. На основании этого исследования можно сделать вывод, что вакцина БМВ обладает защитным действием и специфически безвредна.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках инновационного проекта на основании Государственного заказа ИСС-2012-6-18.

Financial support

The work was carried out within the framework of an innovative project on the basis of the State Order ISS-2012-6-18.

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. Рафиев ХК, Нестеренко ВЕ, Лукьянов НВ, Пиррова АХ. Вспышки брюшного тифа в Республике Таджикистан. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2003;2:9-11.
2. Патент на изобретение IAP 20170193 от 30.12.2022 года «Способ получения жидкой брюшнотифозной молекулярной вакцины и способ лечения (санации) хронического брюшнотифозного бактерионосительства с её применением». Ташкент, 2022, 9 с.

References

1. Rafiev HC, Nesterenko VE, Lukyanov NV, Pyrrova AH. Outbreaks of typhoid fever in the Republic of Tajikistan. Epidemiology and Infectious Diseases. 2003;2:9-11.
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.

Информация о соавторе:

Игнатов Пётр Евгеньевич, доктор биологических наук, профессор, президент IGN-International

Information about co-author:

Peter E. Ignatov, PhD, DSc (Biological Sciences), Professor, President of IGN-International (USA)

Показатели эпидемической обстановки по Конго-Крымской геморрагической лихорадке в республике Узбекистан

Г.Х.Раджабов¹, У.И.Абдурахманов², З.И.Бердиева¹, М.С.Хакимова¹

¹Ташкентский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток, Ташкент, Республика Узбекистан;

²Республиканская санитарно-эпидемиологическая служба Республики Узбекистан, Комитет общественной безопасности и здоровья, Республики Узбекистан

В данной статье проанализирована эпидемическая ситуация на основании данных о случаях заболевания Конго-Крымской геморрагической лихорадкой, зарегистрированных на территории Республики Узбекистан в период с 2011 по 2020 г., а также причины распространения заболевания, провоцирующие факторы. Оценены показатели развития тяжелых последствий (в т.ч. смертельного исхода) у больных, эффективность используемых методов диагностики и лечения. Предложены мероприятия по предотвращению распространения заболевания в последующие годы.

Ключевые слова: Конго-крымская геморрагическая лихорадка, показатели эпидемической ситуации, факторы передачи, диагностика заболевания, лечение больных

Для цитирования: Раджабов Г.Х., Абдурахманов У.И., Бердиева З.И., Хакимова М.С. Показатели эпидемической обстановки по Конго-крымской геморрагической лихорадке в республике Узбекистан. Бактериология. 2023; 8(2): 60–63. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-60-63

Indicators of the epidemic situation in the Crimean-Congo hemorrhagic fever in the republic of uzbekistan

G.H.Radzhabov¹, U.I.Abdurakhmanov², Z.I.Berdieva¹, M.S.Khakimova¹

¹Tashkent Research Institute of Vaccines and Serums (TashNIIVS), Tashkent, Republic of Uzbekistan;

²Sanitary-Epidemiological Welfare and Public Health Service of the Republic of Uzbekistan

This article analyzes the epidemic situation on the basis of data on cases of Crimean-Congo hemorrhagic fever disease registered on the territory of the Republic of Uzbekistan in the period from 2011 to 2020, as well as the causes of the spread of the disease, the factors that provoke it, as well as the indicators of the development of severe consequences (including number of deaths) in patients, the effectiveness of the diagnostic and treatment methods used, and measures to prevent the spread of the disease in subsequent years.

Key words: Crimean-Congo hemorrhagic fever, indicators of the epidemic situation, transmission factors, diagnosis of the disease, treatment of patients

For citation: Radzhabov G.H., Abdurakhmanov U.I., Berdieva Z.I., Khakimova M.S. Indicators of the epidemic situation in the Crimean-Congo hemorrhagic fever in the republic of Uzbekistan. Bacteriology. 2023; 8(2): 60–63. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-60-63

Конго-Крымская геморрагическая лихорадка (ККГЛ) – природно-очаговое заболевание, вызываемое арбовирусом (*Nairovirus*, семейство *Bunyaviridae*) – имеет сезонное эндемическое (именно в районах с природными очагами) распространение.

Переносчиками возбудителей являются клещи, а территории, где они присутствуют, являются природными очагами болезни. Клещи в основном липнут к животным чтобы пи-

таться их кровью, а люди заражаются при укусах клещей во время ухода за животными или при загрязнении рук клещевой кровью [1, 2].

Природные очаги болезни располагаются в странах Балканского полуострова, таких как Болгария, Словения, Хорватия, Венгрия, в Турции, Украине, Южно-Кавказском регионе России, в странах Азии – Пакистане, Индии, Иране, странах Восточной и Западной Африки, а также странах

Для корреспонденции:

Раджабов Гулам Хурсанович, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией общей эпидемиологии Ташкентского научно-исследовательского института вакцин и сывороток

Адрес: Республика Узбекистан, 100084, Ташкент, ул. Чингиза Айтматова, 37
Телефон: (+998) 71 234-77-67
E-mail: gulomr@mail.ru

Статья поступила 22.05.2023, принята к печати 30.06.2023

For correspondence:

Gulam Kh. Radzhabov, PhD, MD, Head of the Laboratory of General Epidemiology of the Tashkent Research Institute of Vaccines and Serum (TashNIIVS)

Address: 37 Chingiz Aitmatov str., Tashkent, 100084, Republic of Uzbekistan
Phone: (+998) 71 234-77-67
E-mail: gulomr@mail.ru

The article was received 22.05.2023, accepted for publication 30.06.2023

Центральной Азии – Казахстане, Кыргызстане, Туркменистане, Таджикистане и Узбекистане, т.е. в странах, расположенных южнее 50-й параллели северной широты [3–6].

По данным Всемирной организации здравоохранения, это заболевание встречается с частотой 4–5 случаев в год в странах Балканского полуострова, Украине, 85–90 случаев в Российской Федерации, до 30 случаев в странах Африки, до 70 случаев в Иране и Пакистане, 15–25 случаев в странах Центральной Азии, всего в мире регистрируется от 300 до 450 случаев в год [2, 7, 8].

Несмотря на то, что удельный вес ККГЛ среди инфекционных болезней не очень велик, заболевание достаточно распространено, его быстрая трансмиссивность (контагиозность), высокая смертность, а также тот факт, что заболевание все чаще регистрируется среди населения, требуют большего внимания.

Летальность при кратковременной вспышке ККГЛ в одном регионе достигает 40%, особенно при передаче заболевания от человека к человеку, и этот показатель может быть еще выше при распространении болезни по типу внутрибольничной инфекции из-за отсутствия своевременного правильного диагноза [9].

Болезнь прогрессирует медленно при передаче через укус клеща или контакт с кровью клеща, начало сходно с острыми респираторными заболеваниями, латентный период может длиться от 7 до 14 дней. При передаче от человека к человеку заболевание протекает бурно, латентный период может сокращаться с 1–2 дней до 2–3 ч, быстро поражаются мелкие капилляры и внутренние органы. Наличие у больного хронических заболеваний желудочно-кишечной системы, печени и почек вызывает очень неблагоприятные состояния и приводит к еще большему увеличению смертности [2, 9].

Вакцины против этого заболевания для людей и животных на сегодняшний день не разработано.

В последние годы развитие международной торговли, развитие миграции животных и увеличение ареалов обитания клещей по всему миру в результате ежегодного потепления климата способствуют расширению эндемичных зон для ККГЛ [2].

При этом расширение эндемичных ареалов наблюдается и внутри стран. Например, изначально болезнь регистрировали в южных регионах России, таких как Краснодарский край, Крым и Ростовская область, но сегодня заболевание выявляют и в регионах Северного Кавказа.

У больных с тяжелым течением заболевания и летальным исходом, а также в 1–3-и сутки от начала заболевания количество противовирусных антител в крови настолько мало, что они могут не определяться [3]. С целью профилактики и лечения тяжелого течения болезни, а также для экстренной профилактики среди контактирующих используют иммуноглобулин из гетерогенной лошадиной крови, иммунную сыворотку, плазму или иммуноглобулин из сыворотки крови инфицированного человека [3, 9]. Принимая во внимание вышеизложенное, а также сохранение сложности эпидемической ситуации по ККГЛ на территории Республики Узбекистан в ближайшие годы и опасность завоза этого заболевания из зарубежных стран, авторами был проведен эпидемиологический анализ.

Цель исследования: оценка эпидемической ситуации по ККГЛ в Республике и определение провоцирующих ее факторов.

Задачи исследования: сбор и изучение данных о случаях заболевания ККГЛ, зарегистрированных на территории Республики Узбекистан в 2011–2020 гг.; подготовка выводов и рекомендаций по результатам анализа.

Материалы и методы

В исследовании ретроспективно проанализированы данные, предоставляемые в Службу санитарно-эпидемиологического благополучия и общественного здоровья Республики Узбекистан и ее областные управления по заболеваемости ККГЛ в 2011–2020 гг., изучены отчеты о выявленных случаях и карты эпидемиологического обследования.

Результаты

За последние 10 лет 61% всех случаев ККГЛ выявлен в Кашкадарьинской, Бухарской и Навоийской областях. В частности, 25,3% выявленных больных приходится на Кашкадарьинскую область.

В этот период также увеличилось число районов, где были выявлены случаи ККГЛ. Если до 2012 г. заболевание было зарегистрировано в 4 регионах республики, то к 2020 г. остается только 3 региона, где заболевание еще не было выявлено.

При изучении динамики многолетних показателей болезни четких периодов подъема и снижения не наблюдалось. Если за последние 10 лет наибольшее количество случаев было зафиксировано в 2012 г. (интенсивный показатель 0,2), то в последующие годы показатель снижался (0,06; 0,04; 0,06; 0,07). При этом за последние 2 года число инфицированных вновь увеличилось, составив 0,08 в 2018 г. и 0,08 в 2019 г. В 2020 г. заболеваемость резко снизилась, этот показатель составил 0,02. Однако такая ситуация обусловлена сокращением миграции населения, уменьшением экспорта и импорта мясной продукции в связи с карантинными и ограничительными мерами, принятыми для борьбы с коронавирусной инфекцией в конце 2019 – начале 2020 г. Также это может быть обусловлено тем, что вся деятельность медицинских учреждений была направлена на COVID-19 и мероприятия по раннему диагностированию ККГЛ и помощи в стационаре могли осуществляться не в полной мере. Основанием для такого вывода является то, что у 78,5% пациентов с лабораторно подтвержденной ККГЛ отсутствуют геморрагические симптомы, поэтому ее можно ошибочно принять за другое заболевание.

В лабораторных анализах, проведенных НИИ вирусологии (2017 г.), вирулентность клещей (вирусофорность) составила 47,6% в Ферганской области. При этом за последние 10 лет в регионе не зарегистрировано ни одного случая ККГЛ. Такая ситуация также вызывает подозрение на то, что заболевание протекало в легкой форме без явных клинических признаков или что диагностические мероприятия не были налажены (недостаток диагностики, некомпетентный кадровый потенциал).

При анализе профессиональной деятельности заболевших наибольший показатель (25,8%) приходится на

работающих по другим профессиям, не связанным с сельским хозяйством, 12,9% – на домохозяек. 14,0% инфицированных временно были привлечены к сезонной стрижке шерсти.

44,1% больных заразились через укусы клещей, а в 23,7% случаев больные заразились при раздавливании клещей незащищенными руками.

В Республике для окончательного подтверждения заболевания ККГЛ используется метод иммуноферментного анализа (ИФА). Если методом ИФА клинический диагноз был подтвержден у всех больных, то только 12% из них были дополнительно обследованы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), после чего было подтверждено наличие заболевания.

При помесечном анализе показателей заболеваемости наибольшее количество случаев зарегистрировано в апреле–июне, на этот период приходится 80,6% от общего числа выявленных случаев. В то же время привлекает внимание тот факт, что регистрация случаев заболевания в Бухарской области имеет раннее начало (март) и более раннее окончание эпидемического сезона (август) по сравнению с другими регионами.

В 49,5% выявленных случаев источником заболевания был мелкий рогатый скот, в 39,0% – крупный рогатый скот, в 6,5% заболевание передалось от больных людей. Еще у 5% больных источник инфекции не установлен.

При анализе установлено, что в Навоийской и Ташкентской областях в результате ручного снятия и измельчения клещей с домашнего скота заражение болезнью происходит чаще, чем в других регионах, – 72% заразившихся таким путем в республике зарегистрированы именно в Навоийской и Ташкентской областях.

Заключение

В Узбекистане эндемичными по данному заболеванию считаются районы Республики Каракалпакстан, Бухарская, Навоийская, Кашкадарьинская и Ташкентская области.

Регистрация заболевания ККГЛ в последние годы в Джизакской, Сырдарьинской и Самаркандской областях показывает, что в Узбекистане расширяется ареал клещей-носителей возбудителя. В связи с тем, что крупный и мелкий рогатый скот, содержащийся в личных подсобных хозяйствах, своевременно не обрабатывается от бешенства и санитарно-пропагандистская работа по профилактике заболевания ККГЛ не проводится в широких масштабах, заболевание распространяется среди населения. Быстрое развитие симптомов заболевания приводит к высокой летальности на ранних стадиях ККГЛ.

В то же время есть большая необходимость в разработке критериев прогнозирования развития неблагоприятного течения болезни и ее тяжелых последствий. Применяемые на практике диагностические методики для раннего выявления заболевания и предупреждения его тяжелых последствий недостаточно эффективны. Использование в лечении заболевания высокоэффективных противовирусных препаратов и методов, в т.ч. иммуноглобулина, полученного из сыворотки крови человека, инфицированного ККГЛ, приводит к высокой смертности.

Кроме того, не налажено использование иммуноглобулина, полученного из сыворотки крови лиц, инфицированных ККГЛ, при неотложной эпидемической профилактике (специальной профилактике) среди лиц, имевших контакт с инфицированными.

Рекомендации: усиление мероприятий, направленных на совместную работу санитарно-эпидемиологической и ветеринарных служб по обработке сельскохозяйственного скота от клещей и пропаганду на принятие мер по борьбе с чистой животных от клещей незащищенными руками, пренебрежением использования химических веществ во время стрижки, невнимательностью на природе, в результате чего происходит заражение клещами.

В целях раннего выявления заболевания и предупреждения развития его тяжелых последствий после пересмотра применяемой на практике методики диагностики ККГЛ внедрить системы ПЦР-обследования каждого больного с подозрением на ККГЛ, сформировать систему использования иммуноглобулина, полученного из сыворотки крови лиц, инфицированных ККГЛ, в лечении заболевания, и вакцин нового поколения против ККГЛ.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Буаро МИ, Трофимов НМ, Счесленок ЕП, Новик ИИ, Рытик ПГ. Крымская-Конго геморрагическая лихорадка. Медицинские новости. 2012;12:15-18.
2. Бутенко АМ, Трусова ИН. Заболеваемость Крымской геморрагической лихорадкой в странах Европы, Африки и Азии (1943–2012). Эпидемиология и инфекционные болезни. 2013;5.
3. Онищенко ГГ. Об эпидемиологической ситуации и заболеваемости природно-очаговыми инфекциями в Российской Федерации и мерах по их профилактике. Микробиология. 2001;3:22-28.
4. Сапаров ХБ. “Ўта хавфли юкумли касалликлар” услубий қўлланма. 2014. С. 64-67.
5. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. JAMA. 1995 Jan 11;273(2):117-23.
6. Yashina L, Vyshemirskii O, Seregin S, Petrova I, Samokhvalov E, Lvov D, et al. Genetic analysis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Russia. J Clin Microbiol. 2003 Feb;41(2):860-2. DOI: 10.1128/JCM.41.2.860-862.2003
7. Товпинец НН, Евстафьев ИЛ. Природная очаговость зоонозных инфекций в Крыму: эпизоотологический и эпидемиологический аспекты. Материалы III научной конференции. 2005. С. 180-184.
8. Чумаков МП, Лобан КМ. Крымская геморрагическая лихорадка. Большая медицинская энциклопедия. 3-е изд. Москва: Советская энциклопедия, 1989.
9. Yashina L, Petrova I, Seregin S, Vyshemirskii O, Lvov D, Aristova V, et al. Genetic variability of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in Russia and Central Asia. J Gen Virol. 2003 May;84(Pt 5):1199-1206. DOI: 10.1099/vir.0.18805-0

References

1. Boiro MI, Trofimov NM, Schaslionak EP, Novik II, Rytik PG. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Journal of Medical News*. 2012;12:15-18. (In Russian).
2. Butenko IN, Trusova IN. Morbidity of the Crimean hemorrhagic fever in the countries of Europe, Africa and Asia (1943–2012). *Epidemiology and Infectious Diseases (Epidemiologiya i infektsionnye bolezni)*. 2013;5. (In Russian).
3. Onishchenko GG. On the epidemiological situation and incidence of natural focal infections in the Russian Federation and measures for their prevention. *Microbiology*. 2001;3:22-28. (In Russian).
4. Saparov KhB. "Yta khavfli yuqumli kasalliklar" uslubii kyllanma. 2014. P. 64-67. (In Russian).
5. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA*. 1995 Jan 11;273(2):117-23.
6. Yashina L, Vyshemirskii O, Seregin S, Petrova I, Samokhvalov E, Lvov D, et al. Genetic analysis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Russia. *J Clin Microbiol*. 2003 Feb;41(2):860-2. DOI: 10.1128/JCM.41.2.860-862.2003
7. Tovpinets NN, Evstaf'ev IL. Prirodnaya ochagovost' zoonoznykh infektsii v Krymu: epizootologicheskii i epidemiologicheskii aspekty. *Materialy III nauchnoi konferentsii*. 2005. P. 180-184. (In Russian).
8. Chumakov MP, Loban KM. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Bol'shaya meditsinskaya entsiklopediya*. 3-e izd. Moskva: Sovetskaya entsiklopediya, 1989. (In Russian).
9. Yashina L, Petrova I, Seregin S, Vyshemirskii O, Lvov D, Aristova V, et al. Genetic variability of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in Russia and Central Asia. *J Gen Virol*. 2003 May;84(Pt 5):1199-1206. DOI: 10.1099/vir.0.18805-0

Информация о соавторах:

Абдурахманов Улугбек Исмаилович, лаборант лаборатории особо опасных инфекционных болезней Республиканской санитарно-эпидемиологической службы Республики Узбекистан, Комитет общественной безопасности и здоровья

Бердиева Зулхумор Ильмуратовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории общей эпидемиологии Ташкентского научно-исследовательского института вакцин и сывороток

Хакимова Малохат Сайфитдиновна, младший научный сотрудник лаборатории общей эпидемиологии Ташкентского научно-исследовательского института вакцин и сывороток

Information about co-authors:

Ulugbek I. Abdurakhmanov, Laboratory Assistant of Especially Dangerous Infectious Diseases of the Sanitary-Epidemiological Welfare and Public Health Service of the Republic of Uzbekistan

Zulhumor I. Berdieva, PhD, MD, Senior Researcher of the Laboratory of the Tashkent Research Institute of Vaccines and Serums (TashNIIVS)

Malokhat S. Khakimova, Junior Researcher of the Laboratory of General Epidemiology of the Tashkent Research Institute of Vaccines and Serums (TashNIIVS)

НОВОСТИ НАУКИ

Кровь белохвостого оленя убивает бактерии, вызывающие болезнь Лайма

Исполнительный директор Центра передового опыта в области трансмиссивных заболеваний (NEWVEC) Массачусетского университета в Амхерсте и его команда завершили исследование, которое предлагает многообещающее преимущество в борьбе с болезнью Лайма.

Исследование демонстрирует, что кровь белохвостого оленя убивает бактерию, вызывающую болезнь Лайма, потенциально изнурительное заболевание. По оценкам Центров по контролю и профилактике заболеваний (CDC), ежегодно около 476 000 человек диагностируют и лечат от болезни Лайма, самой распространенной трансмиссивной болезни в США.

Олени жизненно важны для выживания оленьих клещей, но они не связаны с передачей бактерий Лайма, *Borrelia burgdorferi*. Известно, что клещи, взятые у белохвостых оленей, не инфицированы, и исследователи предположили, что что-то в оленях предотвращает заражение этих клещей.

В ходе этих экспериментов определили, что сыворотка белохвостого оленя убивает бактерию Лайма. Следующим важным вопросом будет понимание того, как именно кровь оленя убивает эту бактерию.

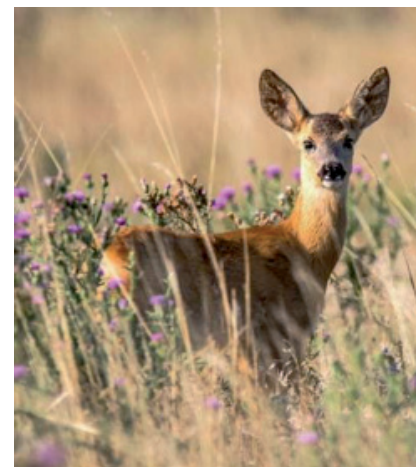
Бактерия болезни Лайма передается молодым черноногим (*Ixodes scapularis*) оленьим клещам от мышей, которыми питаются членистоногие. Зараженные клещи затем передают бактерию людям, когда питаются людьми.

Люди – случайный хозяин. Клещи, которые кусают нас, на самом деле ищут оленей, потому что именно на них они размножаются. Без оленей у вас не было бы клещей. Но если бы у вас были только олени, у вас не было бы Лайма.

Что бы ни было в олене, что убивает микроб, это часть врожденной иммунной системы, часть иммунной системы, которая предшествует антителам.

Бактерия Лайма имеет белки на своей поверхности, которые защищают ее от врожденной иммунной системы человека. Кровь оленя в чем-то отличается, так что бактерии Лайма, по-видимому, не могут защитить себя от врожденной иммунной системы белохвостого оленя.

Следующим шагом исследования является определение точных механизмов в крови оленей, убивающих бактерии.



Pearson P, et al.

White-Tailed Deer Serum Kills the Lyme Disease Spirochete, Borrelia burgdorferi. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2023;C. vbz.2022.0095.

Photorhabdus spp.: от симбиоза к паразитизму

Н.А.Липатникова, С.В.Дентовская

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

Представители рода *Photorhabdus* spp. завоевывают все больше внимания в научных исследованиях. Род включает строгих энтомопатогенов и виды, вызывающие инфекцию у людей, и предоставляет прекрасную модель для изучения эволюции паразитизма: симбионт для нематод, патоген для насекомых и людей. В настоящем обзоре представлено внутривидовое разнообразие *Photorhabdus* spp. Подробно описаны жизненный цикл бактерий *Photorhabdus* spp. и патогенность для разных животных моделей, а также изменения, произошедшие с патогеном беспозвоночных при адаптации к теплокровным хозяевам. Рассмотрены молекулярные основы уникальной способности представителей рода к биолюминесценции. Определены перспективы использования антимикробного пептида *Photorhabdus* spp. для разработки лекарственных препаратов против грамотрицательных патогенов.

Ключевые слова: *Photorhabdus*, симбиоз, патогенность, фоторабдоз, сравнительная геномика, лекарственные средства на основе пептидов

Для цитирования: Липатникова Н.А., Дентовская С.В. *Photorhabdus* spp.: от симбиоза к паразитизму. Бактериология. 2023; 8(2): 64–71. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-64-71

Photorhabdus spp.: from symbiosis to parasitism

N.A.Lipatnikova, S.V.Dentovskaya

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

Representatives of the genus *Photorhabdus* spp. are gaining more and more attention in research. The genus includes strict entomopathogens and species caused infection in humans and provides an excellent model for studying the evolution of parasitism: symbiont for nematodes, pathogen for insects and people. This review presents intraspecific diversity of *Photorhabdus* spp. The life cycle of bacteria *Photorhabdus* spp. and pathogenicity for different animal models are described in detail, as well as the changes that occurred with the pathogen of invertebrates during adaptation to warm-blooded hosts. The molecular basis of the unique ability to bioluminescence of representatives of the genus is considered. The prospects of using the antimicrobial peptide of *Photorhabdus* spp have been determined for the development of drugs against gram-negative pathogens.

Key words: *Photorhabdus*, symbiosis, pathogenicity, photorhabdosis, comparative genomics, peptide drugs

For citation: Lipatnikova N.A., Dentovskaya S.V. *Photorhabdus* spp.: from symbiosis to parasitism. Bacteriology. 2023; 8(2): 64–71. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-64-71

Бактерии рода *Photorhabdus* – симбионты нематод семейства *Heterorhabditidae*, широко распространены на всех континентах, кроме Антарктиды. Наиболее часто их обнаруживают в почве прибрежных территорий [1].

Благодаря продукции токсинов с инсектицидной активностью представители *Photorhabdus* spp. до настоящего времени являются объектом интенсивного изучения с целью получения биопестицидов [2]. Симбиотический комплекс «нематода–бактерия» или очищенные инсектицидные токсины используют в сельском хозяйстве в качестве альтерна-

тивного пестицида для борьбы с личинками многих насекомых-вредителей [3].

Представители *Photorhabdus* spp. являются подвижными биолюминесцентными факультативно-анаэробными бактериями, имеющими форму палочек [4, 5]. Все виды хорошо растут на кровяном агаре при температуре 28°C, образуя специфическую тонкую линию кольцевого гемолиза. Клинические изоляты также хорошо растут в интервале температур 37–42°C. Хотя подвижность и не является абсолютно необходимым фактором патогенности или симбиоза,

Для корреспонденции:

Липатникова Надежда Алексеевна, кандидат биологических наук, 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
E-mail: n.a.lipatnikova@mail.ru

Статья поступила 05.04.2023, принята к печати 30.06.2023

For correspondence:

Nadezhda A. Lipatnikova, PhD in Biological Sciences, researcher of laboratory for plague microbiology State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0117
E-mail: n.a.lipatnikova@mail.ru

The article was received 05.04.2023, accepted for publication 30.06.2023

установлено, что штаммы, обладающие этим свойством, имеют преимущество в ходе колонизации насекомого [6].

Виды *P. asymbiotica* и *P. australis* приобрели патогенность для человека, сохранив способность заражать насекомых. При температуре тела человека у указанных видов происходят изменения в экспрессии генов, кодирующих факторы патогенности, и генов, связанных с метаболизмом [7].

В настоящем обзоре представлено внутривидовое разнообразие *Photorhabdus* spp. Подробно описан жизненный цикл бактерий *Photorhabdus* spp. и патогенность для разных животных моделей, а также изменения, произошедшие с патогеном беспозвоночных при адаптации к теплокровным хозяевам. Рассмотрены молекулярные основы уникальной способности представителей рода к биолюминесценции. Определены перспективы использования антимикробного пептида *Photorhabdus* spp. для разработки лекарственных препаратов против граммотрицательных патогенов.

Таксономическое положение

Представители *Photorhabdus* spp. принадлежат к семейству *Morganellaceae* [8]. N.E. Boemare et al. [9] предложили выделить *Photorhabdus luminescens* в отдельный род в 1993 г. С этого времени были обнаружены многочисленные виды и подвиды. Сейчас род *Photorhabdus* включает 22 вида: *P. aegyptia*, *P. akhurstii*, *P. antumapuensis*, *P. asymbiotica*, *P. australis*, *P. bodei*, *P. caribbeanensis*, *P. cinerea*, *P. hainanensis*, *P. heterorhabditis*, *P. hindustanensis*, *P. kayaii*, *P. kharii*, *P. kleinii*, *P. laumondii*, *P. luminescens*, *P. namnaonensis*, *P. noenieputensis*, *P. stackebrandtii*, *P. tasmaniensis*, *P. temperata* и *P. thracensis*. У шести видов описаны подвиды – по два внутри каждого: у *P. akhurstii* – *akhurstii* и *bharatensis*; у *P. australis* – *australis* и *thailandensis*; у *P. heterorhabditis* – *heterorhabditis* и *aluminescens*; у *P. kharii* – *kharii* и *guanajuatensis*; у *P. laumondii* – *laumondii* и *clarkei*; у *P. luminescens* – *luminescens* и *mexicana*¹ [10].

Жизненный цикл бактерий

Известно, что жизненный цикл бактерий рода *Photorhabdus* начинается и заканчивается колонизацией кишечного тракта нематоды, находящейся в непитающейся стадии, называемой инвазионной личинкой (ИЛ) [11]. ИЛ проникают в тело насекомого непосредственно через кутикулу [11–13] или через естественные отверстия (рот, анус, дыхальца) [14], затем оказываются в незамкнутой кровеносной системе насекомого, гемоцели. Попадая в гемоцель, нематоды высвобождают симбиотических бактерий в гемолимфу, последнее, начав размножаться, выделяют токсины, способные вызвать гибель насекомого в течение 24 ч [11, 15]. Все изученные штаммы *Photorhabdus* spp. обладают высокой патогенностью для насекомых ($LD_{50} < 100$ м.к.) [14]. Бактерии рода *Photorhabdus* успешно уклоняются от системы врожденного иммунитета насекомого, вызывая его гибель, превращают ткани мертвого насекомого в питательный бульон, способствуя репродукции нематод, и затем снова колонизируют их на стадии ИЛ [16]. Кроме того, фоторабдусы выделяют целый спектр антимикробных субстанций, препятствующих размножению других микроорганизмов. После не-

скольких циклов репродукции потомство нематод получает неохарактеризованные сигналы из окружающей среды, которые стимулируют появление нового поколения инвазионных личинок, колонизированных бактериями. На заключительном этапе сотни тысяч ИЛ со своими симбионтами, *Photorhabdus* spp., покидают оболочку насекомого в поисках новой добычи [17].

Живые энтомопатогенные нематоды, используемые в качестве препаратов для борьбы с насекомыми, размножаются внутри насекомых-хозяев, оказывая долгосрочное, устойчивое воздействие на популяцию вредителей [18], но эффективны в узком диапазоне значений влажности и температуры почвы, хранятся при низкой, оптимальной для вида, температуре, что ограничивает их применение [19].

Бактерии *Photorhabdus* spp. нельзя использовать в качестве инсектицидов из-за отсутствия способности длительно сохраняться в почве отдельно от энтомопатогенных нематод. По этой причине инсектицидные вещества (в частности белки-токсины) воспроизводят в других организмах: бактериях и растениях [20]. Например, продукты генов *P. luminescens*, кодирующих токсины, после клонирования и экспрессии в клетках бактерии *Escherichia coli* показали значительный пестицидный потенциал [21].

Биолюминесценция

Одной из уникальных характеристик бактерий рода *Photorhabdus* является способность к биолюминесценции. Люминесценция наблюдается у всех штаммов при достижении конца экспоненциальной фазы роста при культивировании на плотных или в жидких питательных средах. *In vivo* свечение можно обнаружить только после гибели насекомого или деградация его тканей [22]. Несмотря на существование множества светящихся водных бактерий (*Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio cholerae*, *Photobacterium leiognathi*, *Photobacterium phosphoreum*, *Shewanella haneli*), фоторабдусы являются единственным представителем почвенных микроорганизмов, способным испускать свет. Существует много спекуляций по поводу причины биолюминесценции у фоторабдусов. Одни исследователи считают, что функциональная значимость люминесценции может состоять в отпугивании некрофагов, ведущих ночной образ жизни, является сигналом, который передается от бактерии к бактерии или от бактерии к нематоду и синхронизирует симбиоз и действует как приманка для насекомого-добычи [23]. Наряду с этим существует мнение, что продукция света представителями *Photorhabdus* не выполняет никакой жизненно важной функции, а лишь является характерной чертой его водного предшественника, которая сохранилась при колонизации нематодами почвенной среды, или может быть лишь случайным проявлением горизонтального переноса генов, для исчезновения которого еще не прошло достаточно эволюционного времени [24].

Фермент, катализирующий эмиссию света у штаммов *Photorhabdus* spp., является типичной бактериальной люциферазой [25], которая использует молекулярный кислород для окисления двух субстратов: длинноцепочечного алифатического альдегида и флавиномононуклеотида. Данная реакция сопровождается зелено-голубым свечением ($\lambda = 490$ нм). По температурной зависимости, кинетике све-

¹Далее название видов и подвидов приводится согласно тексту статей, указанных в ссылках.

чения и альдегидному ингибированию субстрата люцифераза *P. luminescens* имеет большее сходство с ферментом бактерии *V. harvey*, чем с люциферазами других видов морских светящихся бактерий (*V. fischeri*, *Photobacterium phosphoreum* и *Photobacterium leiognathi*) [26]. Ответственные за продукцию люциферазы гены *lux* фоторабдусов и других биoluminesцентных бактерий [27–32] составляют оперон, организация которого варьирует от бактерии к бактерии [33]. Е.А.Meighen и R.B.Szittner [33] установили высокий консерватизм нуклеотидной последовательности структурных генов оперона *luxCDABE* у трех изученных штаммов *P. luminescens* (идентичность 85–90%). При этом аминокислотная последовательность белков LuxA и LuxB *P. luminescens* оказалась сходной с аминокислотной последовательностью соответствующих белков *V. harveyi* (83–85% и 58–59% соответственно) [34]. Поскольку бактерии рода *Photorhabdus* филогенетически изолированы от подобных им морских светящихся бактерий, это может являться примером горизонтального переноса генов *lux* оперона.

Патогенность *Photorhabdus* spp.

Насекомые

Насекомые обладают многокомпонентной иммунной системой, некоторые из защитных механизмов которой подобны механизмам системы врожденного иммунитета млекопитающих [35]. Фоторабдусы должны противостоять системе врожденного иммунитета насекомого: или уклониться от распознавания, или подавить его иммунный ответ [36]. Представители *Photorhabdus* spp. обладают множеством факторов патогенности, которые обеспечивают защиту бактерий от гуморального и клеточного иммунитета насекомых-хозяев, а также вызывают гибель этих насекомых.

Для оценки вирулентности штаммов *Photorhabdus* spp. традиционно используют два вида насекомых – представителей чешуекрылых: *Galleria mellonella* (большая восковая моль) и *Manduca sexta* (табачный бражник). Кроме того, в последнее время используют представителя двукрылых – *Drosophila melanogaster*, преимуществом которого является полностью секвенированный геном и легкость проведения генетических манипуляций [37–40].

С помощью метода иммуногистохимии установлено, что в желудке насекомого бактерии экспрессируют по крайней мере два фактора патогенности: комплекс токсинов A (toxin complex A/Tca) и металлопротеазу PrtA [22, 41]. Тесная ассоциация бактерий с эпителием и секреция вышеперечисленных белков ведут к быстрой деструкции желудка хозяина.

Другим активным в отношении клеток желудка токсином, продуцируемым всеми бактериями рода *Photorhabdus*, является мультидоменный Mcf1. Этот белок попадает в клетку-мишень путем эндоцитоза и индуцирует апоптоз [42, 43]. Данный токсин обладает низкой специфичностью и, кроме того, может индуцировать апоптоз гемоцитов и широкого круга клеточных линий человека. Ген *mcf1* обнаружен во всех известных к настоящему времени штаммах *Photorhabdus* spp., но в каждом случае может кодироваться разными генетическими локусами, что подтверждает его независимое приобретение [44]. В двух штаммах *P. luminescens*, W14 и TT01, обнаружен гомолог, названный Mcf2. Данный белок отличается от Mcf1 по строению домена активного сайта, но

также индуцирует апоптоз и, кроме того, гомологичен вызывающему апоптоз токсину HrmA *Pseudomonas* spp. [45].

Клеточный иммунный ответ насекомых опосредуется циркулирующими гемоцитами, которые участвуют в фагоцитозе, нодуляции или инкапсуляции патогенов, проникших в гемоцель. На более позднем этапе иммунного ответа происходит агрегация гемоцитов вокруг чужеродных микроорганизмов [46, 47]. Бактерии рода *Photorhabdus* синтезируют целый набор цитолитических/гемолизисов и токсинов, некоторые из которых индуцируют некроз или апоптоз при добавлении к культурам иммунных клеток насекомых. Подобно многим патогенным грамотрицательным бактериям, *P. luminescens* обладает системой секреции третьего типа, которая обеспечивает устойчивость к фагоцитозу и предотвращает образование нодул. Показано, что эффекторный белок LopT, кодируемый системой секреции третьего типа *P. luminescens* TT01 и W14, гомологичен белку YopT *Yersinia* spp. и предотвращает захват бактерий гемоцитами [46, 48]. В одной из кассет вирулентности *Photorhabdus* обнаружена открытая рамка считывания, продукт которой гомологичен LopT. Известно, что кассеты вирулентности *Photorhabdus* кодируют подобные R-типу пиоцинов структуры, которые предположительно могут выступать в качестве систем доставки различных токсичных продуктов к клеткам мишеням [49]. Штаммы *P. luminescens* TT01 и *P. asymbiotica* ATCC43949 несут несколько локусов, кодирующих «кассеты вирулентности», с предполагаемыми различными эффекторными белками, гомологичными токсину A *Clostridium difficile* (Mcf), YopT *Yersinia enterocolitica* (LopT), активному домену цитотоксического некротизирующего фактора 1 (cytotoxic necrotizing factor 1 / CNF1) *E. coli* и другие, не имеющие известных гомологов и представляющие собой новые эффекторы [50]. Учитывая множественность и разнообразие «кассет вирулентности», можно предположить, что их продукты могут обладать токсичностью в отношении различных групп насекомых или, в случае *P. asymbiotica*, млекопитающих [49].

В геноме штаммов *P. luminescens* и *P. asymbiotica* обнаружены бинарные системы токсичности, кодирующие два белка PirA и PirB [51, 52] и белки, гомологичные HaxA и HaxB, впервые обнаруженные у близкородственного патогена насекомых *Xenorhabdus nematophila* [53, 54]. Токсины PirAB проявляют активность против личинок *Galleria* spp., гусениц *Plutella xylostella* и трех видов комаров: *Aedes aegypti*, *Culex pipiens* и *Anopheles gambiae* [51, 55]. Кроме того, PirAB оказывают цитолитический, гемолитический и проапоптотический эффекты на клетки насекомых и млекопитающих. Более того, в двух полностью секвенированных геномах *Photorhabdus* spp. обнаружены два гена, кодирующих гемолизисы, обладающие цитотоксическим эффектом [55, 56].

Установлено, что вторичные метаболиты стильбена (3,5-дигидрокси-4-изопропилстильбен), выделяемого *Photorhabdus* spp., являются мощными ингибиторами фенолоксидазы, что позволяет фоторабдусам избежать развития меланотической капсуляции в организме насекомого [57].

Другими гуморальными факторами, которым должны противостоять представители *Photorhabdus* spp., являются циркулирующий лизоцим и антимикробные пептиды. Гуморальный иммунный ответ у насекомых реализуется посредством широкого спектра антимикробных пептидов, вза-

имедействующих с клеточной оболочкой бактерий [58]. Хотя фоторабдусы и индуцируют транскрипцию мРНК катионных антимикробных пептидов (КАМП) насекомых, до настоящего времени не ясно, устойчивы ли они к КАМП специфически или блокируют их трансляцию или секрецию.

Установлено, что у *Salmonella* spp. замещение фосфатных групп липида А 4-аминоарабинозой находится под контролем оперона *pmrHFIJKLM*, активность которого регулируется двухкомпонентной сигнальной системой PhoP–PhoQ [59, 60]. Подобно сальмонеллам, бактерии *P. luminescens* противостоят действию КАМП, модифицируя свои поверхностные слои. У *P. luminescens* введение мутаций в ген *phoP* и ген *pbpE1*, гомологичный гену *pmrK* *Salmonella* spp., приводит к увеличению чувствительности к КАМП и снижению вирулентности для насекомых [61, 62].

Многие энтомопатогенные бактерии секретируют протеазы, которые разрушают КАМП. Установлено, что при введении чешуйчатокрылым металлопротеаза PrtA бактерий рода *Photorhabdus* разрушает цекропины А и В, а также ингибирует антибактериальную активность насекомого [63]. Таким образом, иммунная система насекомого распознает *P. luminescens*, но бактериям удается преодолеть действие КАМП.

Все животные-хозяева находятся в антагонистических взаимоотношениях со своими бактериальными паразитами в борьбе за поглощение железа (комплексонов железа). Подобно другим патогенам животных, бактерии рода *Photorhabdus* обладают несколькими системами связывания и поглощения железа, включающими продукцию сидерофора пробактина [63]. Установлено, что мутанты по гену *exbD* штамма *P. temperata* K122 не способны потреблять железо и аттенуированы по отношению к насекомым [64].

Культуры тканей

Для исследования взаимодействия *P. asymbiotica* и макрофагоподобных клеточных линий используют культуры тканей. N.R. Waterfield et al. [23], а также S.C. Costa et al. [65] установили, что штаммы *P. asymbiotica* являются факультативными внутриклеточными патогенами, способными реплицироваться внутри мышинных и человеческих макрофагоподобных клеточных линий. Это подтверждает и обнаружение гена *sopB* в клинических изолятах *P. asymbiotica*, и отсутствие данного гена у *P. luminescens*. Кроме того, S.C. Costa et al. [65] показали, что наряду с человеческими клеточными линиями штаммы *P. asymbiotica* способны проникать в гемоциты насекомых. Установлено, что штаммы *P. asymbiotica* subsp. *australis* способны инвазировать нефагоцитирующие клеточные линии и индуцируют апоптоз клеток человека быстрее, чем штаммы *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* [65]. Способность *P. asymbiotica* проникать в иммунные клетки подтверждает наблюдаемые в клинике случаи бактериемии и предоставляет бактериям нишу, где они становятся недоступны для гуморального иммунного ответа млекопитающего. Данное поведение подобно поведению другого родственного микроорганизма, *Yersinia pestis*, который также является факультативным внутриклеточным патогеном, индуцирует апоптоз макрофагов и не вызывает выраженную воспалительную реакцию, что предоставляет ему возможность распространения по лимфатической системе.

Лабораторные животные

Фоторабдоз воспроизведен на модели теплокровных лабораторных животных [66]. Штаммами *Photorhabdus* spp., отличающимися по патогенности для человека, заражали мышей линии Balb/c. Бактерии видов *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* и *P. asymbiotica* subsp. *australis*, способные вызывать заболевания у людей, обладали умеренной вирулентностью для лабораторных животных. При заражении дозами 10^6 – 10^8 КОЕ наблюдалась клиническая картина инфекции, подобная таковой у людей, и гибель ~50–100% животных. Гибель мышей линии BALB/c была вызвана инфекционно-токсическим шоком и связана с расстройством гемодинамики, изменением свертываемости крови и нарушением лимфопоза в органах иммуногенеза. Представитель патогенного только для насекомых вида *P. temperata* subsp. *cinerea* не вызывал гибели мышей. Реакция на его введение ограничивалась образованием небольшого количества плазматических клеток в селезенке и лимфатических узлах.

Фоторабдоз у человека

В отличие от других представителей рода *P. asymbiotica* может инфицировать людей [67]. Зарегистрировано 20 случаев заболеваний фоторабдозом: 8 в США [68–70], 11 в Австралии [3, 71–74] и 1 в России [75]. У пациентов в США и Австралии инфекция сопровождалась появлением на коже гноящихся язв, поражением мягких тканей, в 80% случаев – гематогенной диссеминацией, а в 30% случаев – бактериемией [3, 68, 72]. Случай, описанный в России, отличался локализацией инфекции. *P. asymbiotica* вызвал острый пиелонефрит на фоне мочекаменной болезни. В бактериологическом посеве мочи из почки при чрескожной пункционной нефростомии наблюдался рост *P. asymbiotica* 1×10^6 КОЕ/мл. Больному проводилась антибактериальная терапия препаратами группы фторхинолонов [75].

Вероятно, число заболевших людей значительно выше, чем это отражено в научных публикациях. Трудности идентификации данной бактерии связаны с тем, что *P. asymbiotica* не была внесена в стандартные базы данных клинической бактериологии [69, 70, 72].

P. asymbiotica может инфицировать пациентов с ослабленным иммунитетом, но является первичным, а не оппортунистическим патогеном. Не обнаружено связи между инфицированием человека и такими предполагающими факторами заболевания, как возраст, пол и др. Большинство заболеваний описаны как случаи локальных или диссеминированных поражений мягких тканей с тенденцией к образованию болезненных некротических язв. У многих пациентов обнаруживали отдаленные от первичного места внедрения инфекции изъязвления мягких тканей, свидетельствующие о гематогенной диссеминации возбудителя. Возбудителя инфекции выделяли из гноя первичного очага инфицирования, из крови, в одном случае из слюны пациентов и еще в одном случае – из мочи [72, 75]. Бактериальный штамм, выделенный от пациента из города Кингслифа, проявлял слабую люминесценцию при выращивании в жидкой питательной среде при температуре 30°C, но строгую эмиссию света при температуре 37°C, подтверждая интригующую всех возможность свечения поражений мягких тканей у инфицированных [76]. У заболевших людей из Австралии и

США наблюдали рецидивы фоторабдоза после лечения антибиотиками в течение нескольких недель [72]. Этиотропная терапия инфекции должна основываться на *in vitro* чувствительности возбудителя к антибиотикам [71].

P.Wilkinson et al. [77] провели сравнительный анализ геномов патогенного для людей штамма *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* ATCC43949 и энтомопатогенного штамма *P. luminescens* TT01 и составили исчерпывающий список геномных различий. Установлено, что каждый патоген содержит около 1 млн уникальных пар оснований ДНК. У патогенного для человека штамма *P. asymbiotica* размер генома меньше (5 064 808 п.о.), чем у патогена насекомых *P. luminescens* (5 688 987 п.о.). Уменьшение генома *P. asymbiotica* сопровождалось снижением разнообразия генов, кодирующих инсектицидные токсины, и фоторабдусных «кассет вирулентности». Также показано, что геном *P. asymbiotica* дополнительно содержит плазмиду, родственную плазмиде *Y. pestis* pMT, и некоторое количество новых островов патогенности, включая остров патогенности, кодирующий систему секреции третьего типа. По-видимому, вирулентность представителей *P. asymbiotica* по отношению к человеку явилась следствием приобретения плазмиды подобной pMT и некоторых специфических эффекторов, например SopB, который способствует выживанию бактерий внутри макрофагов. Способность штаммов *P. asymbiotica* расти при температуре 37°C играет важную роль в патогенезе фоторабдоза у человека. Протеомный анализ клеточных супернатантов и клеток *P. asymbiotica*, выращенных при температурах 30 и 37°C, выявили индукцию при повышенной температуре двух белков «теплового шока»: гомолога ClpB (pau03190) и гомолога HtpG (pau03384). Кроме повышенной температуры при внедрении в тело человека, бактерии *P. asymbiotica* должны противостоять его системе врожденного иммунитета. Установлено, что при температуре 37°C, но не при 30°C, клетки *P. asymbiotica* секретируют белок, гомологичный белку Ail *Y. pestis*, обеспечивающему прикрепление к клеткам млекопитающих и устойчивость к комплементу сыворотки [12]. Кроме того, установлено, что утрата инсектицидных генов у *P. asymbiotica* не сопровождается потерей патогенности по отношению к насекомым [54].

Использование антимикробного пептида *Photorhabdus* spp. для разработки лекарственных препаратов против грамотрицательных патогенов

Всемирная организация здравоохранения опубликовала список бактерий, для борьбы с которыми срочно требуется создание новых антибиотиков. Грамотрицательные патогены, такие как *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*, приобрели устойчивость к большинству, а в некоторых случаях ко всем антибиотикам, доступным в клинической практике [78]. Внешняя мембрана грамотрицательных бактерий предотвращает проникновение нежелательных соединений в клетку и содержит помпы множественной лекарственной устойчивости, которые откачивают молекулы, попавшие в клетку. Однако уникальная среда и компоненты внешней мембраны и периплазматического пространства являются потенциальными мишенями для селективных грамотрицательных агентов. К

таким агентам относятся недавно описанные макроциклические пептиды, один из них – даробактин [79].

Антимикробный пептид даробактин был впервые выделен из штамма *P. khanii* HGB1456, является пептидом рибосомального синтеза [78]. В составе даробактина есть два макроцикла, образованных перекрестным связыванием боковых цепей триптофана и лизина [79]. Даробактин активен в отношении многих грамотрицательных бактерий, включая патогенов человека с лекарственной устойчивостью, среди них *P. aeruginosa* с устойчивостью к полимиксину, *K. pneumoniae* и *E. coli* с устойчивостью к β-лактамам. *In vitro* эффективность даробактина была подтверждена *in vivo* на зараженных мышинных моделях. Даробактин не токсичен для клеток человека (*in vitro*) в концентрациях, в которых он является эффективным антибиотиком. В серии экспериментов были определены механизм действия и мишень антимикробного пептида. Внешняя мембрана грамотрицательных бактерий содержит белки со структурой β-бочонков. Белок BamA является центральным компонентом комплекса для сбора β-бочонков и катализирует упаковку и встраивание новых белков во внешнюю мембрану [80]. Даробактин связывается с BamA и стабилизирует белок в конформации с закрытыми латеральными воротами, предотвращая выход субстратов во внешнюю мембрану [78]. Как следствие происходит пузырение мембраны и в результате набухание и лизис клеток [81].

Заключение

Представители рода *Photorhabdus* являются прекрасной моделью для изучения симбиоза и патогенности. Бактерии *P. asymbiotica* патогенны для насекомых и человека, на их примере можно понять, какую роль играют беспозвоночные в возникновении болезней человека. Постгеномные технологии и генетические модификации бактерий, симбиотических нематод, насекомых-хозяев позволят нам получить новые данные о взаимосвязи между патогенностью и симбиозом. У бактерий *Photorhabdus* spp. большое количество кластеров генов вторичных метаболитов, благодаря чему они могут быть источником лекарственных препаратов-кандидатов.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was supported by the Sectoral Scientific 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. Boemare NE. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: R. Gaugler (ed.). Entomopathogenic nematology. Wallingford: CABI Publishing; 2002. DOI: 10.1079/9780851995670.0035

2. Ehlers RU. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001 Sep;56(5-6):623-33. DOI: 10.1007/s002530100711
3. Peel MM, Alfredson DA, Gerrard JG, Davis JM, Robson JM, McDougall RJ, et al. Isolation, identification, and molecular characterization of strains of *Photorhabdus luminescens* from infected humans in Australia. *J Clin Microbiol.* 1999 Nov;37(11):3647-53. DOI: 10.1128/JCM.37.11.3647-3653.1999
4. Ffrench-Constant R, Bowen D. *Photorhabdus* toxins: novel biological insecticides. *Curr Opin Microbiol.* 1999 Jun;2(3):284-8. DOI: 10.1016/s1369-5274(99)80049-6
5. Ffrench-Constant RH, Bowen DJ. Novel insecticidal toxins from nematode-symbiotic bacteria. *Cell Mol Life Sci.* 2000 May;57(5):828-33. DOI: 10.1007/s000180050044
6. Easom CA, Clarke DJ. Motility is required for the competitive fitness of entomopathogenic *Photorhabdus luminescens* during insect infection. *BMC Microbiol.* 2008 Oct 3;8:168. DOI: 10.1186/1471-2180-8-168
7. Hapeshi A, Waterfield NR. *Photorhabdus asymbiotica* as an Insect and Human Pathogen. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017;402:159-177. DOI: 10.1007/82_2016_29
8. Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, S Gupta R. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016 Dec;66(12):5575-5599. DOI: 10.1099/ijsem.0.001485
9. Boemare NE, Akhurst RJ, Mourant RG. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp (*Enterobacteriaceae*), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1993;43:249-255. DOI: 10.1099/00207713-43-2-249
10. Castaneda-Alvarez C, Machado RAR, Morales-Montero P, Boss A, Muller A, Prodan S, et al. *Photorhabdus antumapuensis* sp. nov., a novel symbiotic bacterial species associated with *Heterorhabditis atacamensis* entomopathogenic nematodes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2022 Oct;72(10). DOI: 10.1099/ijsem.0.005525
11. Forst S, Dowds B, Boemare N, Stackebrandt E. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annu Rev Microbiol.* 1997;51:47-72. DOI: 10.1146/annurev.micro.51.1.47
12. Akhurst R, Dunphy GB. Tripartite interactions between symbiotically associated ento-mopathogenic bacteria, nematodes, and their insect hosts. In: Beckage N, Thompson S, Federici B (Eds.). *Parasites and Pathogens of Insects*. New York: Academic; 1993.
13. Poinar GOJ. Biology and taxonomy of *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*. In: Gaugler R, Kaya HK (eds.). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press, Boca Raton, FL; 1990.
14. Boemare N. Interactions between the partners of the entomopathogenic bacterium nematode complexes, *Steinernema* – *Xenorhabdus* and *Heterorhabditis* – *Photorhabdus*. *Nematology.* 2002a;4:601-603. DOI: 10.1163/15685410260438863
15. Ciche TA, Ensign JC. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? *Appl Environ Microbiol.* 2003 Apr;69(4):1890-7. DOI: 10.1128/AEM.69.4.1890-1897.2003
16. Goodrich-Blair H, Clarke DJ. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. *Mol Microbiol.* 2007 Apr;64(2):260-8. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05671.x
17. Forst S, Neelson K. Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. *Microbiol Rev.* 1996 Mar;60(1):21-43. DOI: 10.1128/mr.60.1.21-43.1996
18. Peters A. The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp and their impact on insect populations. *Biocontrol Sci Technol* 1996;6:389-402. DOI: 10.1080/09583159631361
19. Lacey LA, Georgis R. Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production. *J Nematol.* 2012 Jun;44(2):218-25.
20. Dutta TK, Phani V, Mandal A. *Photorhabdus* bacterial toxins as a candidate for insect pest bio-management: an update. *Indian Entomologist.* 2022;3(2):6-27.
21. Bowen D, Rocheleau TA, Blackburn M, Andreev O, Golubeva E, Bhartia R, et al. Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science.* 1998 Jun 26;280(5372):2129-32. DOI: 10.1126/science.280.5372.2129
22. Daborn PJ, Waterfield N, Blight MA, Ffrench-Constant RH. Measuring virulence factor expression by the pathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* in culture and during insect infection. *J Bacteriol.* 2001 Oct;183(20):5834-9. DOI: 10.1128/JB.183.20.5834-5839.2001
23. Waterfield NR, Ciche T, Clarke D. *Photorhabdus* and a host of hosts. *Annu Rev Microbiol.* 2009;63:557-74. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073507
24. Peat SM, Adams BJ. Natural selection on the *luxA* gene of bioluminescent bacteria. *Symbiosis.* 2008;46:101-108.
25. Poinar GO Jr, Thomas GM, Haygood M, Neelson KH. Growth and luminescence of the symbiotic bacteria associated with the terrestrial nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Soil Biol Biochem.* 1980;12:5-10. DOI: 10.1016/0038-0717(80)90095-4
26. Szittner R, Meighen E. Nucleotide sequence, expression, and properties of luciferase coded by lux genes from a terrestrial bacterium. *J Biol Chem.* 1990 Sep 25;265(27):16581-7.
27. Baldwin TO, Devine JH, Heckel RC, Lin JW, Shadel GS. The complete nucleotide sequence of the *lux* regulon of *Vibrio fischeri* and the *luxABN* region of *Photobacterium leiognathi* and the mechanism of control of bacterial bioluminescence. *J Biolumin Chemilumin.* 1989 Jul;4(1):326-41. DOI: 10.1002/bio.1170040145
28. Cochrum L, Hruska KS, Rucker EB, Johnston TC. The nucleotide sequence of the *luxD* gene of *Xenorhabdus luminescens* Hm. *Nucleic Acids Res.* 1990 Sep 25;18(18):5570. DOI: 10.1093/nar/18.18.5570
29. Frackman S, Anhalt M, Neelson KH. Cloning, organization, and expression of the bioluminescence genes of *Xenorhabdus luminescens*. *J Bacteriol.* 1990 Oct;172(10):5767-73. DOI: 10.1128/jb.172.10.5767-5773.1990
30. Frackman S, Neelson KH. The molecular genetics of *Xenorhabdus*. In: Gaugler R, Kaya H (ed.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.; 1990.
31. Friedland J, Hastings JW. Nonidentical subunits of bacterial luciferase: their isolation and recombination to form active enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1967 Dec;58(6):2336-42. DOI: 10.1073/pnas.58.6.2336
32. Xi L, Cho KW, Tu SC. Cloning and nucleotide sequences of *lux* genes and characterization of luciferase of *Xenorhabdus luminescens* from a human wound. *J Bacteriol.* 1991 Feb;173(4):1399-405. DOI: 10.1128/jb.173.4.1399-1405.1991
33. Meighen EA, Szittner RB. Multiple repetitive elements and organization of the *lux* operons of luminescent terrestrial bacteria. *J Bacteriol.* 1992 Aug;174(16):5371-81. DOI: 10.1128/jb.174.16.5371-5381.1992
34. Johnston TC, Rucker EB, Cochrum L, Hruska KS, Vandegriff V. The nucleotide sequence of the *luxA* and *luxB* genes of *Xenorhabdus luminescens* HM and a comparison of the amino acid sequences of luciferases from four species of bioluminescent bacteria. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990 Jul 31;170(2):407-15. DOI: 10.1016/0006-291x(90)92106-a
35. Uvell H, Engström Y. A multilayered defense against infection: combinatorial control of insect immune genes. *Trends Genet.* 2007 Jul;23(7):342-9. DOI: 10.1016/j.tig.2007.05.003
36. Klein M. Efficacy against soil-inhabiting insect pests. In: Gaugler RR, Kaya HK (ed.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla; 1990.
37. Khush RS, Lemaitre B. Genes that fight infection: What the *Drosophila* genome says about animal immunity. *Trends Genet.* 2000;16(10):442-449. DOI: 10.1016/S0168-9525(00)02095-3

38. Tzou P, De Gregorio E, Lemaitre B. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol.* 2002 Feb;5(1):102-10. DOI: 10.1016/s1369-5274(02)00294-1
39. Vodovar N, Acosta C, Lemaitre B, Boccard F. *Drosophila*: a polyvalent model to decipher host-pathogen interactions. *Trends Microbiol.* 2004;12(5):235-242. DOI: 10.1016/j.tim.2004.03.007
40. Hallem EA, Rengarajan M, Ciche TA, Sternberg PW. Nematodes, bacteria, and flies: a tripartite model for nematode parasitism. *Curr Biol.* 2007;17(10):898-904. DOI: 10.1016/j.cub.2007.04.027
41. Silva CP, Waterfield NR, Daborn PJ, Dean P, Chilver T, Au CP, et al. Bacterial infection of a model insect: *Photobacterium luminescens* and *Manduca sexta*. *Cell Microbiol.* 2002 Jun;4(6):329-39. DOI: 10.1046/j.1462-5822.2002.00194.x
42. Daborn PJ, Waterfield N, Silva CP, Au CP, Sharma S, French-Constant RH. A single *Photobacterium* gene, makes caterpillars floppy (mcf), allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Aug 6;99(16):10742-7. DOI: 10.1073/pnas.102068099
43. Dowling AJ, Daborn PJ, Waterfield NR, Wang P, Streuli CH, French-Constant RH. The insecticidal toxin Makes caterpillars floppy (Mcf) promotes apoptosis in mammalian cells. *Cell Microbiol.* 2004 Apr;6(4):345-53. DOI: 10.1046/j.1462-5822.2003.00357.x
44. Waterfield NR, Daborn PJ, French-Constant RH. Insect pathogenicity islands in the insect pathogenic bacterium *Photobacterium*. *Physiol Entomol.* 2004;29:240-250. DOI: 10.1111/j.0307-6962.2004.00407.x
45. Waterfield NR, Daborn PJ, Dowling AJ, Yang G, Hares M, French-Constant RH. The insecticidal toxin Makes caterpillars floppy 2 (Mcf2) shows similarity to HrmA, an avirulence protein from a plant pathogen. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;229(2):265-270. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00846-2
46. French-Constant R, Waterfield N, Daborn P, Joyce S, Bennett H, Au C, et al. *Photobacterium*: Towards a functional genomic analysis of symbiont and pathogen. *FEMS Microbiol Rev.* 2003;26:433-456. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2003.tb00625.x
47. Dean P, Richards EH, Edwards JP, Reynolds SE, Charnley K. Microbial infection causes the appearance of hemocytes with extreme spreading ability in monolayers of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Dev Comp Immunol.* 2004 Jun;28(7-8):689-700. DOI: 10.1016/j.dci.2003.11.006
48. Brugirard-Ricaud K, Duchaud E, Givaudan A, Girard PA, Kunst F, Boemare N, et al. Site-specific antipathogenic function of the *Photobacterium luminescens* type III secretion system during insect colonization. *Cell Microbiol.* 2005 Mar;7(3):363-71. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2004.00466.x
49. Yang G, Dowling AJ, Gerike U, French-Constant RH, Waterfield NR. *Photobacterium* virulence cassettes confer injectable insecticidal activity against the wax moth. *J Bacteriol.* 2006;188:2254-2261. DOI: 10.1128/JB.188.6.2254-2261.2006
50. French-Constant RH, Dowling A, Waterfield NR. Insecticidal toxins from *Photobacterium* bacteria and their potential use in agriculture. *Toxicon.* 2007;49:436-451. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.11.019
51. Duchaud E, Rusniok C, Frangeul L, Buchrieser C, Givaudan A, Taourit S, et al. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photobacterium luminescens*. *Nat Biotechnol.* 2003 Nov;21(11):1307-13. DOI: 10.1038/nbt886
52. Sicard M, Hering S, Schulte R, Gaudriault S, Schulenburg H. The effect of *Photobacterium luminescens* (*Enterobacteriaceae*) on the survival, development, reproduction and behaviour of *Caenorhabditis elegans* (*Nematoda: Rhabditidae*). *Environ Microbiol.* 2007;9(1):12-25. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2006.01099.x
53. Vigneux F, Zumbihl R, Jubelin G, Ribeiro C, Poncet J, Baghdigui S, et al. The *xaxAB* genes encoding a new apoptotic toxin from the insect pathogen *Xenorhabdus nematophila* are present in plant and human pathogens. *J Biol Chem.* 2007 Mar 30;282(13):9571-9580. DOI: 10.1074/jbc.M604301200
54. Waterfield NR, Sanchez-Contreras M, Eleftherianos I, Dowling A, Yang G, Wilkinson P, Parkhill J, Thomson N, Reynolds SE, Bode HB, Dorus S, French-Constant RH. Rapid Virulence Annotation (RVA): identification of virulence factors using a bacterial genome library and multiple invertebrate hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Oct 14;105(41):15967-72. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Feb 10;106(6):2083. Yang, Guowei [added]. DOI: 10.1073/pnas.071114105
55. Waterfield N, Kamita SG, Hammock BD, French-Constant R. The *Photobacterium* Pir toxins are similar to a developmentally regulated insect protein but show no juvenile hormone esterase activity. *FEMS Microbiol Lett.* 2005 Apr 1;245(1):47-52. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.02.018
56. Brillard J, Duchaud E, Boemare N, Kunst F, Givaudan A. The PhIA hemolysin from the entomopathogenic bacterium *Photobacterium luminescens* belongs to the two-partner secretion family of hemolysins. *J Bacteriol.* 2002;184(14):3871-3878. DOI: 10.1128/JB.184.14.3871-3878.2002
57. Eleftherianos I, Boundy S, Joyce SA, Aslam S, Marshall JW, Cox RJ, et al. An antibiotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defenses through phenoloxidase inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Feb 13;104(7):2419-24. DOI: 10.1073/pnas.0610525104
58. Nappi AJ, Ottaviani E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays.* 2000 May;22(5):469-80. DOI: 10.1002/(SICI)1521-1878(200005)22:5<469::AID-BIES9>3.0.CO;2-4
59. Guo L, Lim KB, Gunn JS, Bainbridge B, Darveau RP, Hackett M, et al. Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes *phoP-phoQ*. *Science.* 1997 Apr 11;276(5310):250-3. DOI: 10.1126/science.276.5310.250
60. Gunn JS, Belden WJ, Miller SI. Identification of PhoP-PhoQ activated genes within a duplicated region of the *Salmonella typhimurium* chromosome. *Microb Pathog.* 1998 Aug;25(2):77-90. DOI: 10.1006/mpat.1998.0217
61. Derzelle S, Turlin E, Duchaud E, Pages S, Kunst F, Givaudan A, et al. The PhoP-PhoQ two-component regulatory system of *Photobacterium luminescens* is essential for virulence in insects. *J Bacteriol.* 2004 Mar;186(5):1270-9. DOI: 10.1128/JB.186.5.1270-1279.2004
62. Bennett HPJ, Clarke DJ. The *phgPE* operon in *Photobacterium luminescens* is required for pathogenicity and symbiosis. *J Bacteriol.* 2005;187:77-84. DOI: 10.1128/JB.187.1.77-84.2005
63. Cabral CM, Cherqui A, Pereira A, Simões N. Purification and characterization of two distinct metalloproteases secreted by the entomopathogenic bacterium *Photobacterium* sp. strain Az29. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Jul;70(7):3831-8. DOI: 10.1128/AEM.70.7.3831-3838.2004
64. Watson RJ, Joyce SA, Spencer GV, Clarke DJ. The *exbD* gene of *Photobacterium temperata* is required for full virulence in insects and symbiosis with the nematode *Heterorhabditis*. *Mol Microbiol.* 2005 May;56(3):763-73. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04574.x
65. Costa SC, Girard PA, Brehélin M, Zumbihl R. The emerging human pathogen *Photobacterium asymbiotica* is a facultative intracellular bacterium and induces apoptosis of macrophage-like cells. *Infect Immun.* 2009 Mar;77(3):1022-30. DOI: 10.1128/IAI.01064-08
66. Киршева НА, Ганина ЕА, Комбарова ТИ, Шайхутдинова РЗ, Дентовская СВ, Анисимов АП. Инфекционная чувствительность мышей линии BALB/c к заражению *Photobacterium asymbiotica* и *Photobacterium temperata*. Проблемы особо опасных инфекций. 2012;3(113):64-66. / Kirsheva NA, Ganina EA, Kombarova TI, Shaikhutdinova RZ, Dentovskaya SV, Anisimov AP. Infectious Sensitivity of BALB/c Mice to Infestation with *Photobacterium asymbiotica* and *Photobacterium temperata*. Problemy osobo opasnykh infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections). 2012;3(113):64-66. (In Russian).
67. Mulley G, Beeton ML, Wilkinson P, Vlisidou I, Ockendon-Powell N, Hapeshi A, et al. From Insect to Man: *Photobacterium* Sheds Light on the Emergence of Human Pathogenicity. *PLoS One.* 2015 Dec 17;10(12):e0144937. DOI: 10.1371/journal.pone.0144937
68. Farmer JJ 3rd, Jorgensen JH, Grimont PA, Akhurst RJ, Poinar GO Jr, Ageron E, et al. *Xenorhabdus luminescens* (DNA hybridization group 5) from human clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1989 Jul;27(7):1594-600. DOI: 10.1128/jcm.27.7.1594-1600.1989

69. Weissfeld AS, Halliday RJ, Simmons DE, Trevino EA, Vance PH, O'Hara CM, et al. *Photorhabdus asymbiotica*, a pathogen emerging on two continents that proves that there is no substitute for a well-trained clinical microbiologist. *J Clin Microbiol*. 2005 Aug;43(8):4152-5. DOI: 10.1128/JCM.43.8.4152-4155.2005
70. Dutta A, Flores AR, Revell PA, Owens L. Neonatal Bacteremia and Cutaneous Lesions Caused by *Photorhabdus luminescens*: A Rare Gram-Negative Bioluminescent Bacterium. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2018 Aug 17;7(3):e182-e184. DOI: 10.1093/jpids/piy064
71. Gerrard JG, McNevin S, Alfredson D, Forgan-Smith R, Fraser N. *Photorhabdus* species: bio-luminescent bacteria as emerging human pathogens? *Emerg Infect Dis*. 2003 Feb;9(2):251-4. DOI: 10.3201/eid0902.020222
72. Gerrard J, Waterfield N, Vohra R, French-Constant R. Human infection with *Photorhabdus asymbiotica*: an emerging bacterial pathogen. *Microbes Infect*. 2004 Feb;6(2):229-37. DOI: 10.1016/j.micinf.2003.10.018
73. Gerrard JG, Joyce SA, Clarke DJ, French-Constant RH, Nimmo GR, Looke DF, et al. Nematode symbiont for *Photorhabdus asymbiotica*. *Emerg Infect Dis*. 2006 Oct;12(10):1562-4. DOI: 10.3201/eid1210.060464
74. Gerrard JG, Stevens RP. A Review of Clinical Cases of Infection with *Photorhabdus asymbiotica*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2017;402:179-191. DOI: 10.1007/82_2016_56
75. Авдошин ВП, Макаров ОВ, Киричек АА, Шехтман МС, Кещьян КС. *Photorhabdus asymbiotica* – новый представитель грамтрицательной микрофлоры в инфекции мочевых путей. Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2013;4:94-99. / Avdoshin VP, Makarov OV, Kirichek AA, Shekhtman MS, Kesh'yan KS. *Photorhabdus asymbiotica* – a new representative of the gram-negative microflora in urinary tract infections. Vestnik Rossiiskogo Universiteta Druzhby Narodov. Seriya: Meditsina (RUDN Journal Of Medicine). 2013;4:94-99. (In Russian).
76. Plichta KL, Joyce SA, Clarke D, Waterfield N, Stock SP. *Heterorhabditis gerrardi* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae): the hidden host of *Photorhabdus asymbiotica* (Enterobacteriaceae: gamma-Proteobacteria). *J Helminthol*. 2009 Dec;83(4):309-20. DOI: 10.1017/S0022149X09222942
77. Wilkinson P, Waterfield NR, Crossman L, Corton C, Sanchez-Contreras M, Vlisidou I, et al. Comparative genomics of the emerging human pathogen *Photorhabdus asymbiotica* with the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*. *BMC Genomics*. 2009 Jul 7;10:302. DOI: 10.1186/1471-2164-10-302
78. Imai Y, Meyer KJ, Iinishi A, Favre-Godal Q, Green R, Manuse S, et al. A new antibiotic selectively kills Gram-negative pathogens. *Nature*. 2019 Dec;576(7787):459-464. Erratum in: *Nature*. 2020 Apr;580(7802):E3. DOI: 10.1038/s41586-019-1791-1
79. McLaughlin MI, van der Donk WA. The Fellowship of the Rings: Macrocyclic Antibiotic Peptides Reveal an Anti-Gram-Negative Target. *Biochemistry*. 2020 Feb 4;59(4):343-345. DOI: 10.1021/acs.biochem.9b01086
80. Sousa MC. New antibiotics target bacterial envelope. *Nature*. 2019;576:389-90. DOI: 10.1038/d41586-019-03730-x
81. Uptert G, Luther A, Obrecht D, Ermert P. Emerging peptide antibiotics with therapeutic potential. *Med Drug Discov*. 2021 Mar;9:100078. DOI: 10.1016/j.medidd.2020.100078

Информация о соавторе:

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

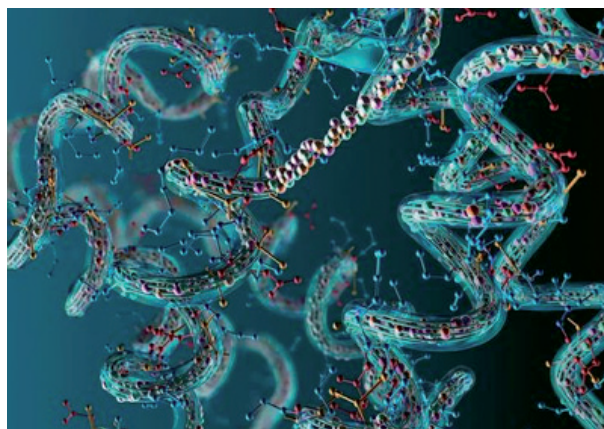
Information about co-author:

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

НОВОСТИ НАУКИ

Искусственный интеллект можно использовать для разработки новых белков

Конструирование фермента de novo стремится ввести активные центры и карманы для связывания субстрата, которые, по прогнозам, будут катализировать интересующую реакцию, в геометрически совместимые нативные каркасы 1, 2, но это было ограничено отсутствием подходящих белковых структур и сложностью нативной белковой последовательности. – структурировать отношения. Описан подход «семейной галлюцинации», основанный на глубоком обучении, который генерирует большое количество идеализированных белковых структур, содержащих различные формы карманов, и разработанные последовательности, которые их кодируют. Авторы использовали эти каркасы для создания искусственных люцифераз, которые избирательно катализируют окислительную хемилюминесценцию синтетических субстратов люциферина дифенилтеразина-3 и 2-дезоксикоэлэнтеразина. Разработанные активные центры располагают группу аргинина и гуанидиния рядом с анионом, который образуется во время реакции в связывающем кармане с высокой степенью комплементарности по форме. Для обоих субстратов люциферина мы получаем сконструированные люциферазы с высокой селективностью; наиболее активным из них является небольшой (13,9 кДа) и термостабильный (с температурой плавления >95°C) фермент, обладающий каталитической эффективностью на дифенилтеразине (kcat/Km = 106 M⁻¹ s⁻¹), сравнимой с таковой нативных люцифераз, но с гораздо более высокой субстратной специфичностью. Создание с нуля высокоактивных и специфических биокатализаторов с широким применением в биомедицине является ключевой вехой для вычислительного дизайна ферментов, и наш подход должен позволить генерировать широкий спектр люцифераз и других ферментов.



Yeh AHW, Norn C, Kipnis Y, et al.
De novo design of luciferases using deep learning.
Nature. 2023;614:774–780. DOI: 10.1038/S41586-023-05696-3

Патогенетический потенциал *Vibrio vulnificus* как возбудителя септических инфекций

С.Ю.Темякова, Р.В.Писанов, Е.В.Ступникова

Ростовский-на-Дону противочумный институт, Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Vibrio vulnificus – галофильная грамотрицательная бактерия, относящаяся к роду *Vibrio* и семейству *Vibrionaceae*. *V. vulnificus* может вызывать серьезные, в т.ч. смертельные, инфекции: первичную септицемию, связанную с употреблением зараженных морепродуктов, раневые инфекции, возникающие при воздействии загрязненной морской воды на открытую рану, реже – инфекции желудочно-кишечного тракта. Летальность при развитии первичного сепсиса достигает 50%, а смерть обычно наступает в течение 72 ч после появления первых симптомов.

В данной обзорной работе описываются ключевые аспекты биологии *V. vulnificus*, включающие в себя факторы вирулентности и их регуляцию, информацию о биотипах и генотипах патогена, особенности выживания как в окружающей среде, так и в организме человека, а также способы диагностики и генотипирования. Анализ литературных источников за последние 10 лет показал, что микроорганизм имеет ряд факторов, вызывающих патогенные проявления при попадании в организм человека, такие как гемолизин, металлопротеиназа, липополисахарид, MARTX, капсула, сидерофоры, система утилизации и получения железа. При этом отмечается, что основную роль в развитии патогенеза играют качественный состав эффекторных доменов MARTX и способность бактерии к капсулообразованию. Несмотря на большое количество исследований, детерминанты вирулентности четко не определены и нельзя с уверенностью разделить вирулентные и авирулентные штаммы.

В последние годы интерес к исследованию морского вибриона возрос, вероятно в связи с его расширяющимся географическим ареалом. Высокий уровень смертности, связанный с данной инфекцией, указывает на необходимость модернизации программ информирования для групп риска. Ввиду достаточно разнообразного проявления инфекции встает проблема ранней диагностики и генотипирования. Необходим комплексный подход к изучению патогена и мониторинг распространения штаммов на территории Российской Федерации.

Ключевые слова: обзор, *Vibrio vulnificus*, септическая инфекция, раневая инфекция, факторы вирулентности, MARTX, капсульный полисахарид, гемолизин

Для цитирования: Темякова С.Ю., Писанов Р.В., Ступникова Е.В. Патогенетический потенциал *Vibrio vulnificus* как возбудителя септических инфекций. Бактериология. 2023; 8(2): 72–78. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-72-78

Pathogenetic potential of *Vibrio vulnificus* as a causative agent of septic infections

S.Yu.Temyakova, R.V.Pisanov, E.V.Stupnikova

Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute, Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation

Vibrio vulnificus – a halophilic gram-negative bacterium belonging to the genus *Vibrio* and the family *Vibrionaceae*. *V. vulnificus* can cause serious and fatal infections: primary septicemia caused by the consumption of contaminated seafood, wound infections that occur when exposed to contaminated sea water on an open wound, rarely infections of the gastrointestinal tract. Mortality in the development of primary sepsis reaches 50%, and death usually occurs within 72 hours after the onset of the first symptoms. This review paper describes key aspects of the biology of *V. vulnificus*, including virulence factors and their regulation, information about the biotypes and genotypes of the pathogen, survival features both in the environment and in the human body, as well as diagnostic and genotyping methods. An analysis of literature sources over the past 10 years has shown that the microorganism has a number of factors that cause pathogenic manifestations when it enters the human body, such as hemolysin, metalloproteinase, lipopolysaccharide, MARTX, capsule, siderophores, iron utilization and production system. It is noted that the qualitative composition of the MARTX effector domains and the ability of the bacterium to form capsules play the main role in the development of pathogenesis. Despite a large number of studies, the determinants of virulence are not clearly defined and it is impossible to distinguish virulent and avirulent strains with certainty.

In recent years, interest in the study of the marine vibrio has increased, probably due to its expanding geographic range. The high mortality rate associated with this infection points to the need for improved information programs for at-risk groups. In view of the rather diverse manifestation of infection, the problem of early diagnosis and genotyping arises. An integrated approach is needed to study the pathogen and monitor the spread of strains on the territory of the Russian Federation.

Key words: review, *Vibrio vulnificus*, septic infection, wound infection, virulence factors, MARTX, capsular polysaccharide

For citation: Temyakova S.Yu., Pisanov R.V., Stupnikova E.V. Pathogenetic potential of *Vibrio vulnificus* as a causative agent of septic infections. Bacteriology. 2023; 8(2): 72–78. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-72-78

Для корреспонденции:

Темякова Светлана Юрьевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40
E-mail: temyakova_sy@antiplague.ru

Статья поступила 26.05.2023, принята к печати 30.06.2023

For correspondence:

Svetlana Yu. Temyakova, Junior researcher, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections of the Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute, Rospotrebnadzor

Адрес: 117/40 M.Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
E-mail: temyakova_sy@antiplague.ru

The article was received 26.05.2023, accepted for publication 30.06.2023

V*ibrio vulnificus* – галофильная грамотрицательная бактерия, относящаяся к роду *Vibrio* и семейству *Vibrionaceae*. *V. vulnificus* может вызывать серьезные, в т.ч. смертельные, инфекции: первичную септицемию, вызванную употреблением зараженных морепродуктов, раневые инфекции, возникающие при воздействии загрязненной морской воды на открытую рану, реже инфекции желудочно-кишечного тракта. Летальность при развитии первичного сепсиса достигает 50%, а смерть обычно наступает в течение 72 ч после появления первых симптомов [1]. По данным CDC, риску инфекции наиболее подвержены мужчины в возрасте старше 45 лет, с сопутствующими заболеваниями печени [2].

Распространенность *V. vulnificus* в большей степени зависит от температуры и солености морской воды [3]. Возбудитель инфекции чаще встречается при температуре воды $\geq 18^{\circ}\text{C}$ и солености ~15–25‰ [4]. Микроорганизм накапливается в устрицах, не вызывая при этом патогенеза. Также *V. vulnificus* повсеместно встречается в аквариумах, что может свидетельствовать об угрозе для содержащихся в неволе морских животных и обслуживающих аквариумы людей [5].

Наибольшее внимание исследованию патогена уделяется в странах Северной и Южной Америки, а также в Японии и Южной Корее. В базе данных National Center of Biotechnology Information (NCBI) насчитывается более 6000 публикаций по изучению *V. vulnificus*, из них 2500 опубликованы за последние 5 лет, что говорит об усиливающемся интересе к проблеме во всем мире. Однако в России данная проблема практически не освещена. Тем временем расширяется географический ареал этих условно-патогенных микроорганизмов и увеличивается их патогенный потенциал. Например, есть данные о вспышках инфекции *V. vulnificus*, зарегистрированных на широтах Балтийского моря [6, 7] и Аляски, ранее считавшихся слишком холодными для развития морского вибриона [8].

В связи с этим возникает необходимость углубленного изучения штаммов *V. vulnificus*, обитающих в акваториях на территории Российской Федерации, создания диагностических систем, оценки возможных клинических случаев заражения людей, мониторинга пищевой продукции, а также более глубокого анализа геномов выделенных микроорганизмов.

Биотипы и генотипы

Известно существование 3 биотипов *V. vulnificus*, а среди штаммов биотипа 1, наиболее часто поражающих человека, выделяют два генотипа. Биотип 1 был описан первым и встречается практически во всех клинических случаях. Биотип 2 вызывает сепсис у угрей, и в редких случаях штаммы этого биотипа вызывали клинические проявления у человека. Биотип 3 был описан совсем недавно, он выделен только от людей с раневыми инфекциями, заразившихся при разведении тилапии на территории Израиля, и генетически представляет собой химеру первых двух биотипов [9]. Филогенетический анализ показал, что популяция *V. vulnificus* делится на две основные линии. В линии I преобладают клинические штаммы, в то время как в линии II – штаммы из источников окружающей среды. Также были идентифицированы две другие небольшие линии: линия III,

включающая штаммы биотипа 3, и линия IV, в которой преобладают штаммы из окружающей среды [10]. Линия I также известна как С (Clinical – характерная для клинических штаммов), линия II – как Е (Environmental – характерная для штаммов, выделенных из окружающей среды) [11]. Результаты RAPD-ПЦР-анализа¹ многочисленных клинических штаммов и штаммов, выделенных из окружающей среды, позволили выявить ПЦР-ампликон, уникальный для клинических изолятов человека [12, 13]. В дальнейшем полногеномное секвенирование подтвердило существование двух генотипов, С и Е, среди штаммов биотипа 1, а также очень значимую корреляцию С-генотипа со способностью вызывать заболевание у человека [14].

Геном *V. vulnificus*, как и других видов *Vibrio*, представлен двумя хромосомами разного размера. Размер большой хромосомы составляет ~3,2 Мб, тогда как размер малой хромосомы – ~1,8 Мб [11]. У некоторых штаммов отмечают наличие плазмиды. На сегодняшний день в литературе описано по меньшей мере 28 плазмидных профилей. Плазмида вирулентности встречается у штаммов биотипа 2, тогда как конъюгативные плазмиды того же семейства широко распространены среди всех трех биотипов и могут способствовать передаче плазмиды вирулентности [15]. Все эти плазмиды, вероятно, играют важную роль в экологической адаптации и пластичности вида. Наличие плазмид у микроорганизма делает его потенциальным резервуаром генов для других видов бактерий.

Факторы вирулентности и патогенез

V. vulnificus, как и любой микроорганизм, обладающий патогенным потенциалом, имеет ряд факторов, помогающих ему не только проникнуть и сохраниться, но и размножиться, распространиться в тканях и органах организма, воздействуя при этом на его функции. В данном обзоре мы постарались описать факторы патогенности и их регуляторы, наиболее значимые для развития инфекции.

Гемолизин (VVH)

VVH (гемолизин *V. vulnificus*) – токсин, секретируемый во внеклеточное пространство. Кодированная его последовательность содержит две открытые рамки считывания: гены *vvhA* и *vvhB*. Функция гена *vvhB* еще не определена, поэтому в основном рассматривается функция *vvhA*. Ген *vvhA* имеет общую длину 1416 п.н. и присутствует у всех штаммов *V. vulnificus*, являясь структурным геном гемолизина [16]. Гемолизин относится к семейству холестерин-зависимых цитолизин, порообразующих токсинов [17]. Гемолизин водорастворим и термолабилен. Он влияет на воспалительный патогенез, регулируя аутофагическую гибель клеток без апоптотического процесса [18]. Белок VvhA также может вызывать вазодилатацию, играя значительную роль в развитии гипотензивного септического шока [19].

Металлопротеиназа (VVP)

Металлопротеиназа синтезируется в клетках в виде предшественника, в котором различают 4 области: сигнальный пептид, N-концевой домен (nPP), C-концевой домен (Cter100)

¹Полимеразная цепная реакция (ПЦР) со случайной амплификацией полиморфной ДНК (Random Amplification of Polymorphic DNA/RAPD).

и зрелая протеаза, которая образуется в результате самопроцессинга [20].

Сначала металлопротеиназа выполняет роль эластазы, которая увеличивает поверхностную адгезию и проницаемость сосудов в организме хозяина в результате образования брадикинина. Брадикинин, действующий как сосудорасширяющее средство, важен для распространения патогена по организму [21]. Затем происходит активация протромбина и фибринолизина с помощью VVP, что приводит к свертыванию и защищает бактерии от иммунного ответа организма хозяина во время распространения бактериальной инфекции. Металлопротеиназа также может вызывать апоптоз через пути, включающие активацию ERK (extracellular signal-regulated kinase), деградацию коллагена IV типа, высвобождение цитохрома C и активацию каспаз-3 и -9 [22, 23]. Кроме того, VVP может ингибировать экспрессию транскрипции муцина 2, который является важным компонентом кишечного эпителиального барьера, и нарушать структурную целостность кишечного тракта. Таким образом, металлопротеиназа ускоряет попадание *V. vulnificus* из кишечника в кровь, что в конечном итоге приводит к возникновению сепсиса [24, 25]. Однако стоит отметить, что данный фермент также в значительной степени продуцируется у микроорганизма, находящегося в интерстициальных тканях конечностей, где температура ниже, чем в тонком кишечнике и кровотоке, вызывая серьезные коллагенолитические, геморрагические и отежные поражения кожи конечностей [19]. Чаще всего патоген проявляет себя как раневая инфекция, нередко прогрессирует до сепсиса [26]. Можно предположить, что ведущую роль в этом играет металлопротеиназа.

MARTX

MARTX (Multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin) – это многофункциональный самопроцессирующий токсин, содержащий повторы в молекуле белка. Он играет важную роль в сепсисе, вызванном инфекцией *V. vulnificus* [27]. MARTX кодируется геном *rtxA1*, размером около 15,6 т.п.н., и представляет собой токсин, состоящий из областей, содержащих N-концевые повторы, C-концевые повторы и эффекторные домены. MARTX состоит из 5206 аминокислотных остатков, имеет расчетную молекулярную массу 556 кДа. В настоящее время он признан самым крупным полипептидным токсином [28]. Аминокислотные N- и C-концевые повторы образуют поры в мембране эукариотических клеток. Формирование пор облегчает транслокацию центральной области эффекторных доменов в цитозоль эукариот, после чего эффекторы высвобождаются в результате аутопроцессинга. Токсин MARTX, описанный у репрезентативного клинического штамма СМСП6, имеет 5 эффекторных доменов и включает домен неизвестной функции в первом положении (DUF1), Rho-домен инактивации ГТФазы (RID), α/β -гидролазу (ABH), flop-белок (MCF – makes caterpillars floppy-like domain) и Ras/Rap1-специфическую эндопептидазу (RRSP) [29]. Описанные выше домены функционируют по разным биохимическим механизмам, обычно нарушая один из трех ключевых клеточных процессов: изменяют динамику цитоскелета, специфически взаимодействуя с филламином А, тем самым вызывая острую некротическую гибель клеток [30], нарушают передачу сигналов

ГТФазы или везикулярный транспорт [31]. Описан эксперимент, определяющий роль каждого из эффекторных доменов в развитии патогенеза для штамма СМСП6. Результаты данного исследования позволяют предположить, что эффекторные домены DUF1 и ABH фактически снижают вирулентность, а RRSP и RID доминируют над потенциалом вирулентности *V. vulnificus* [30]. Кроме того, MARTX способствует выживанию патогена в организме хозяина, предотвращая его поглощение фагоцитами [32], эту роль также выполняют эффекторные домены [30].

Таким образом, MARTX вызывает некроз кишечных эпителиальных клеток, позволяя *V. vulnificus* проникать напрямую в кровоток, что является доминирующим фактором в развитии сепсиса [33], а качественный состав эффекторных доменов определяет потенциал вирулентности.

Капсульный полисахарид

Капсульный полисахарид (CPS) – еще один ключевой фактор вирулентности *V. vulnificus*. При возникновении и развитии сепсиса способность бактерии обходить иммунный ответ хозяина в основном объясняется наличием капсулы, которая обеспечивает устойчивость к опсонизации комплементом и последующему фагоцитозу макрофагами. Капсула играет значительную роль в развитии септического шока, вероятно, индуцируя чрезмерную продукцию воспалительных цитокинов, через TLR2/NF- κ B-зависимый путь [34]. Ранее были идентифицированы четыре генетических области, которые необходимы для экспрессии и вирулентности CPS. Три являются частью капсульного генного локуса, состоящего из генов биосинтеза, полимеризации и транспорта, сгруппированных на одном хромосомном фрагменте. Четвертая, интегроноподобная, область аналогична области суперинтегрона *V. cholerae* [35]. Моделью для характеристики биосинтеза и генетики капсул многих микроорганизмов, в том числе и *V. vulnificus*, послужила характеристика капсулы *Escherichia coli* [36]. Отдельные моносахариды собираются на липидном носителе ундекапренилфосфате, при этом сборка происходит на внутренней стороне внутренней мембраны. Полимеризация цепи происходит при помощи ферментов гликозилтрансфераз (WecA, WcvE, WcvF, WcvG и WcvI) [37]. Флиппаза Wzx после завершения сборки перемещает моносахариды, не связанные с липидным носителем, через внутреннюю мембрану. Затем моносахариды соединяются вместе на периплазматической стороне внутренней мембраны полимеразой Wxy. В перемещении капсулы через внешнюю мембрану участвуют белки Wza, Wzb и Wzc, представляющие собой белок-транспортёр полисахаридов, фосфатазу и тирозиновую аутокиназу соответственно [38]. Биосинтетическая область включает в себя несколько открытых рамок считывания, которые участвуют в биосинтезе активированных предшественников моносахаридов. Среди описанных генов: ген эпимеразы *wcvA* и дегидрогеназы *wcvB*. Отдельно выделяют гены *rmlA*, *rmlD* и *rmlC*, участвующие в биосинтезе L-рамнозы как наиболее распространенного сахара в капсуле *V. vulnificus*. Вероятно, данная группа генов подвергается полицистронному транскрибированию [37].

Фенотипически наличие или отсутствие капсулы можно определить культивированием на плотных питательных сре-

дах. При этом выделяют два типа колоний *V. vulnificus*: прозрачные и непрозрачные. Прозрачные колонии не образуют капсулы и не патогенны для мышей, а непрозрачные, напротив, вызывают заболевание, а, следовательно, могут противостоять иммунному ответу организма хозяина и обладают антифагоцитарной активностью [39]. Вероятно, между этими двумя морфотипами могут происходить фазовые переходы, причем такие переходы могут быть как обратимыми, так и необратимыми для одного и того же штамма [40]. На фазовые вариации CPS у *V. vulnificus* влияют различные факторы окружающей среды [41]. Таким образом, продукция капсульного полисахарида контролируется как факторами окружающей среды, так генетическими и регуляторными факторами. В то же время патогенность *V. vulnificus* напрямую связана с присутствием капсульного полисахарида, который является важным фактором вирулентности.

Липополисахарид

Некоторые авторы предполагают, что липополисахарид (ЛПС) также является одним из наиболее важных факторов (как и для большинства грамотрицательных бактерий) развития тяжелых инфекций, вызываемых *V. vulnificus*, таких как глубокое повреждение мягких тканей и септический шок [42]. По некоторым данным, заражению описываемым патогеном наиболее подвержены мужчины, тогда как в защите женщин от эндотоксической активности ЛПС *V. vulnificus* участвует эстроген [43].

Все выделенные штаммы разделяют по О-антигену на 7 серогрупп [44]. Среди проанализированных работ встречается мало данных по описанию серогрупп данного вибриона, в связи с чем разработка отечественных сывороток может быть перспективным направлением работы. Также стоит заметить, что в литературе очень мало внимания уделяется изучению генетического строения липополисахаридного кластера, однако исследования в данной области могут помочь в более глубокой характеристике выделенных штаммов. Так, например, структурный анализ липополисахаридного кластера у клинических штаммов показал, что можно выделить не менее пяти антигенных подгрупп. Первая подгруппа наиболее распространена среди данных штаммов. Есть предположение, что-либо присутствие этого типа ЛПС само по себе вызывает повышенную вирулентность, либо этот тип ЛПС является маркером более вирулентных штаммов [45].

Сидерофоры, система утилизации и получения железа

Показано, что люди с ослабленной иммунной системой или хроническими заболеваниями печени, такими как цирроз, в 80 раз чаще, чем здоровые люди, страдают первичной септициемией, вызванной *V. vulnificus* [46]. Эпидемиологические данные подтверждаются лабораторными исследованиями, в которых изучалась роль железа в заболевании, когда повышенный уровень железа в сыворотке крови является характерной чертой для инфицированных людей [47].

Для получения железа из окружающей среды *V. vulnificus* использует вульнибактин, аэробактин, ферриоксамин В, гем и свободные ионы двух- и трехвалентного железа [48]. Первой была охарактеризована структура катехинового сидерофора, названного вульнибактином [49]. Вульнибактин

синтезируется в цитоплазме *V. vulnificus* и транслоцируется во внеклеточное пространство. Изохоризматсинтаза (ICS) и изохоризмататаза (VenB) играют ключевую роль в биосинтезе вульнибактина. Он хелатирует Fe^{3+} в окружающей среде, и комплекс железо–вульнибактин импортируется в периплазму через специфический рецептор внешней мембраны, VuuA. В то время как VuuA является единственным рецептором в системе утилизации трехвалентного железа и вульнибактина, белки HupA и HvtA функционируют как рецепторы гема [48]. Показано, что клинические штаммы *V. vulnificus* способны в большей степени, чем штаммы, выделенные из окружающей среды, продуцировать вульнибактин и использовать железо, связанное с трансферрином [50], что свидетельствует о важной роли системы получения и утилизации железа в развитии патогенеза.

К факторам вирулентности также можно отнести Tad-пили, или пили плотной адгезии, кодируемые тремя локусами гена *tad* [51], а также эффлюкс-помпы для оттока антибактериальных препаратов и других токсичных соединений [52].

Согласно некоторым исследованиям, не только клинические штаммы *V. vulnificus*, но и штаммы, выделенные из окружающей среды, имеют факторы вирулентности [53]. Поэтому именно анализ наличия факторов вирулентности, ответственных за развитие патогенеза, поможет принимать необходимые меры в отношении изолятов, выделяемых на территории Российской Федерации, и оценивать риски инфицирования людей.

Регуляторы факторов вирулентности

Микроорганизм обладает несколькими регуляторами экспрессии факторов вирулентности. Например, уровень сывороточного железа тесно связан с тяжестью инфекции *V. vulnificus* при сепсисе [54]. Также регуляторами вирулентности являются белки LuxS, LuxP-LuxQ, LuxU-LuxO и SmcR (основной регулятор транскрипции для генов-мишеней, контролируемых системой quorum sensing (QC)) [55].

Циклический аденозинмонофосфат (сAMP), основной клеточный сигнальный метаболит, образует комплекс с циклическим аденозинмонофосфатным рецепторным белком (CRP), который может связываться с ДНК и влиять на экспрессию многих генов, таких как гены цитолитина, металлопротеиназы и системы захвата железа [56].

HlyU – белок, регулирующий экспрессию гена гемолизина/цитолитина *vvhA* и гена эластолизической протеазы *vvpE*. HlyU также контролирует экспрессию гена *rtxA1*, ослабляя действие репрессора, конкурируя с его сайтом связывания [57].

Белок AphB является членом семейства регуляторов транскрипции LysR и играет центральную роль в экспрессии генов вирулентности посредством регуляции каскада [58].

Все описанные выше регуляторы необходимы для роста и размножения *V. vulnificus* в крови человека [59].

Диагностика и внутривидовое генотипирование

При подозрении на *V. vulnificus* у человека проводится бактериологическое исследование [60]. При возможности параллельно проводится ПЦР-анализ для ускоренного скрининга. В качестве мишеней для ПЦР-диагностики в литера-

туре описано использование нескольких генов: *vvhA* [61], *gyrB* [62], *vcgC*, *vcgE* и 16S рРНК типа А и В [63].

Внутривидовое генотипирование проводят с целью исследования эпидемиологических случаев и установления родства штаммов. Для внутривидового генотипирования, по данным литературных источников, наиболее часто используются SNP-анализ (Single Nucleotide Polymorphism), MLST (Multilocus sequence typing) и MLVA (Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis).

MLST – типирование на основе мультилокусных последовательностей – активно используется для внутривидового типирования *V. vulnificus*. Схема MLST *V. vulnificus* использует внутренние фрагменты следующих десяти генов домашнего хозяйства: *glp*, *gyrB*, *mdh*, *metG*, *purM*, *dtbS*, *lysA*, *pntA*, *pyrC*, *tnaA*. Авторы разделили исследованные штаммы на 2 линии: MLST А и MLST В [64].

MLVA – мультилокусное исследование на основе VNTR (Variable Number Tandem Repeat). VNTR *V. vulnificus* показывает широкий спектр полиморфизма. В литературе описывается исследование штаммов *V. vulnificus* по 12 VNTR-локусам, в результате которого все изоляты были разделены на 2 группы: группу А, в которую вошли в основном штаммы биотипа 1, и группу В, в которой оказались только представители биотипа 2 [65].

SNP – однонуклеотидный полиморфизм. В целом результаты генотипирования по SNP разделили *V. vulnificus* на три основные филогенетические линии и дополнительную подгруппу, кладу В, состоящую из изолятов, встречающихся только в Израиле [66].

Анализ SNP представляется наиболее удобным для оценки эволюции штаммов и к тому же позволяет проводить полногеномное сравнение, тогда как MLST, например, использует оценку вариативности консервативных генов «домашнего хозяйства» и к тому же является наиболее трудоемким, как и MLVA.

Вероятно, что анализ штаммов, встречающихся на территории нашей страны, покажет иную картину распределения и определит новые филогенетические ветви.

Следует отметить, что ни один из доступных методов обнаружения *V. vulnificus* не позволяет отличить вирулентные штаммы от авирулентных, поскольку детерминанты вирулентности на сегодняшний день четко не определены [67]. Таким образом, поиск маркеров, определяющих патогенность микроорганизма, является ключевым направлением в дальнейших исследованиях.

Заключение

Анализ патогенетического потенциала *V. vulnificus* подчеркивает необходимость развития мониторинга данного патогена. В последние годы географический район распространения вибриона значительно расширился. Высокий уровень смертности, связанный с данной инфекцией, указывает на необходимость модернизации программ информирования для групп риска. Ввиду достаточно разнообразного проявления инфекции встает проблема ранней диагностики и генотипирования. Основной вопрос заключается в том, как достаточно быстро отследить патогенные для человека штаммы в морской воде и морепродуктах. Ответом на данный вопрос может быть комплексный подход к изучению

патогена, включающий в себя геномные исследования, исследования по проявлению вирулентности и условий, ее обуславливающих, а также транскриптомный анализ.

Стоит отметить, что из всех описанных выше факторов вирулентности наиболее весомый вклад в развитие инфекции вносят способность микроорганизма образовывать капсулу и наличие определенных эффекторных доменов MARTX. Эти данные дают основание предположить, что более глубокое исследование именно этих факторов позволит определить истинный вирулентный потенциал *V. vulnificus*.

Вклад авторов

Все авторы внесли значительный вклад в концепцию работы, комплектование, анализ, интерпретацию, составление и доработку работы, окончательное утверждение версии для публикации.

Author contribution

All authors did a significant contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

Источник финансирования

Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Funding source

The authors state that there is no external funding for the study.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Conflict of interest

The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Литература / References

1. Yun NR, Kim DM. *Vibrio vulnificus* infection: a persistent threat to public health. Korean J Intern Med. 2018 Nov;33(6):1070-1078. DOI: 10.3904/kjim.2018.159
2. Baker-Austin C, Oliver JD. *Vibrio vulnificus*: new insights into a deadly opportunistic pathogen. Environ Microbiol. 2018 Feb;20(2):423-430. DOI: 10.1111/1462-2920.13955
3. Sullivan TJ, Neigel JE. Effects of temperature and salinity on prevalence and intensity of infection of blue crabs, *Callinectes sapidus*, by *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus* in Louisiana. J Invertebr Pathol. 2018 Jan;151:82-90. DOI: 10.1016/j.jip.2017.11.004
4. Yun NR, Kim DM. *Vibrio vulnificus* infection: a persistent threat to public health. Korean J Intern Med. 2018 Nov;33(6):1070-1078. DOI: 10.3904/kjim.2018.159
5. Oliver JD. *Vibrio vulnificus*: death on the half shell. A personal journey with the pathogen and its ecology. Microb Ecol. 2013 May;65(4):793-9. DOI: 10.1007/s00248-012-0140-9
6. Kordas RL, Harley CDG, O'Connor MI. Community ecology in a warming world: the influence of temperature on interspecific interactions in marine systems. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2011; 400(1-2):218-226. DOI:10.1016/j.jembe.2011.02.029
7. Baker-Austin C, Triñanes J, Taylor NGH, Hartnell R, Siitonen A, Martinez-Urtaza J, et al. Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. Nature Climate Change. 2013;3(1):73-77. DOI: 10.1038/NCLIMATE1628

8. Martinez-Urtaza J, Bowers JC, Trinanes J, DePaola A. Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses. Food Research International. 43(7):1780-1790. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.04.001
9. Oliver JD. The Biology of *Vibrio vulnificus*. Microbiol Spectr. 2015 Jun;3(3). DOI: 10.1128/microbiolspec
10. Bisharat N, Koton Y, Oliver JD. Phylogeography of the marine pathogen, *Vibrio vulnificus*, revealed the ancestral scenarios of its evolution. Microbiologyopen. 2020 Sep;9(9):e1103. DOI: 10.1002/mbo3.1103
11. López-Pérez M, Jayakumar JM, Haro-Moreno JM, Zaragoza-Solas A, Reddi G, Rodriguez-Valera F, et al. Evolutionary Model of Cluster Divergence of the Emergent Marine Pathogen *Vibrio vulnificus*: From Genotype to Ecotype. mBio. 2019 Feb 19;10(1):e02852-18. DOI: 10.1128/mBio.02852-18
12. Warner JM, Oliver JD. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus* and other *Vibrio* species. Appl Environ Microbiol. 1999 Mar;65(3):1141-4. DOI: 10.1128/AEM.65.3.1141-1144.1999
13. Rosche TM, Yano Y, Oliver JD. A rapid and simple PCR analysis indicates there are two subgroups of *Vibrio vulnificus* which correlate with clinical or environmental isolation. Microbiol Immunol. 2005;49(4):381-9. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2005.tb03731.x
14. Morrison SS, Williams T, Cain A, Froelich B, Taylor C, Baker-Austin C, et al. Pyrosequencing-based comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus* environmental isolates. PLoS One. 2012;7(5):e37553. DOI: 10.1371/journal.pone.0037553
15. Roig FJ, Amaro C. Plasmid diversity in *Vibrio vulnificus* biotypes. Microbiology (Reading). 2009 Feb;155(Pt 2):489-497. DOI: 10.1099/mic.0.023424-0
16. Li G, Wang MY. The role of *Vibrio vulnificus* virulence factors and regulators in its infection-induced sepsis. Folia Microbiol (Praha). 2020 Apr;65(2):265-274. DOI: 10.1007/s12223-019-00763-7
17. Kashimoto T, Sugiyama H, Kawamidori K, Yamazaki K, Kado T, Matsuda K, et al. *Vibrio vulnificus* hemolysin associates with gangliosides. BMC Microbiol. 2020 Mar 30;20(1):69. DOI: 10.1186/s12866-020-01755-1
18. Song EJ, Lee SJ, Lim HS, Kim JS, Jang KK, Choi SH, et al. *Vibrio vulnificus* VvhA induces autophagy-related cell death through the lipid raft-dependent c-Src/NOX signaling pathway. Sci Rep. 2016 Jun 2;6:27080. DOI: 10.1038/srep27080
19. Elgaml A, Miyoshi SI. Regulation systems of protease and hemolysin production in *Vibrio vulnificus*. Microbiol Immunol. 2017 Jan;61(1):1-11. DOI: 10.1111/1348-0421.12465
20. Kawase T, Miura F, Debnath A, Imakura K, Miyoshi SI. Functional analysis of N-terminal propeptide in the precursor of *Vibrio vulnificus* metalloprotease by using cell-free translational system. Protein Expr Purif. 2018 Sep;149:13-16. DOI: 10.1016/j.pep.2018.04.004
21. Lee MA, Kim JA, Yang YJ, Shin MY, Park SJ, Lee KH. VvpM, an extracellular metalloprotease of *Vibrio vulnificus*, induces apoptotic death of human cells. J Microbiol. 2014 Dec;52(12):1036-43. DOI: 10.1007/s12275-014-4531-0
22. Lee TH, Cha SS, Lee CS, Rhee JH, Chung KM. Monoclonal antibodies against *Vibrio vulnificus* RtxA1 elicit protective immunity through distinct mechanisms. Infect Immun. 2014 Nov;82(11):4813-23. DOI: 10.1128/IAI.02130-14
23. Kawase T, Miura F, Debnath A, Imakura K, Miyoshi SI. Functional analysis of N-terminal propeptide in the precursor of *Vibrio vulnificus* metalloprotease by using cell-free translational system. Protein Expr Purif. 2018 Sep;149:13-16. DOI: 10.1016/j.pep.2018.04.004
24. Lee SJ, Jung YH, Oh SY, Jang KK, Lee HS, Choi SH, et al. *Vibrio vulnificus* VvpE inhibits mucin 2 expression by hypermethylation via lipid raft-mediated ROS signaling in intestinal epithelial cells. Cell Death Dis. 2015 Jun 18;6(6):e1787. DOI: 10.1038/cddis.2015.152
25. Lee SJ, Jung YH, Song EJ, Jang KK, Choi SH, Han HJ. *Vibrio vulnificus* VvpE Stimulates IL-1 β Production by the Hypomethylation of the IL-1 β Promoter and NF- κ B Activation via Lipid Raft-Dependent ANXA2 Recruitment and Reactive Oxygen Species Signaling in Intestinal Epithelial Cells. J Immunol. 2015 Sep 1;195(5):2282-93. DOI: 10.4049/jimmunol.1500951
26. Jones MK, Oliver JD. *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis. Infect Immun. 2009 May;77(5):1723-33. DOI: 10.1128/IAI.01046-08
27. Guo RH, Lim JY, Tra My DN, Jo SJ, Park JU, Rhee JH, et al. *Vibrio vulnificus* RtxA1 Toxin Expression Upon Contact With Host Cells Is RpoS-Dependent. Front Cell Infect Microbiol. 2018 Mar 15;8:70. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00070
28. Satchell KJ. MARTX, multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin toxins. Infect Immun. 2007 Nov;75(11):5079-84. DOI: 10.1128/IAI.00525-07
29. Gavin HE, Satchell KJF. RRSP and RID Effector Domains Dominate the Virulence Impact of *Vibrio vulnificus* MARTX Toxin. J Infect Dis. 2019 Feb 23;219(6):889-897. DOI: 10.1093/infdis/jiy590
30. Guo RH, Im YJ, Shin SI, Jeong K, Rhee JH, Kim YR. *Vibrio vulnificus* RtxA1 cytotoxin targets filamin A to regulate PAK1- and MAPK-dependent cytoskeleton reorganization and cell death. Emerg Microbes Infect. 2019;8(1):934-945. DOI: 10.1080/22221751.2019.1632153
31. Woida PJ, Satchell KJF. Coordinated delivery and function of bacterial MARTX toxin effectors. Mol Microbiol. 2018 Jan;107(2):133-141. DOI: 10.1111/mmi.13875
32. Chen CL, Chien SC, Leu TH, Harn HI, Tang MJ, Hor LI. *Vibrio vulnificus* MARTX cytotoxin causes inactivation of phagocytosis-related signaling molecules in macrophages. J Biomed Sci. 2017 Aug 19;24(1):58. DOI: 10.1186/s12929-017-0368-2
33. Jeong HG, Satchell KJ. Additive function of *Vibrio vulnificus* MARTX(Vv) and VvhA cytolytins promotes rapid growth and epithelial tissue necrosis during intestinal infection. PLoS Pathog. 2012;8(3):e1002581. Erratum in: PLoS Pathog. 2019 Jun 19;15(6):e1007895. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002581
34. Lee BC, Kim MS, Choi SH, Kim TS. Involvement of capsular polysaccharide via a TLR2/NF-kappaB pathway in *Vibrio vulnificus*-induced IL-8 secretion of human intestinal epithelial cells. Int J Mol Med. 2010 Apr;25(4):581-91. DOI: 10.3892/ijmm.00000380
35. Цырулина ОА, Чемисова ОС, Носков АК. Факторы патогенности *Vibrio vulnificus*. Обзор. Здоровье населения и среда обитания – ЗНСО. 2022;30(6):59-65. / Tsyulina OA, Chemisova OS, Noskov AK. Pathogenicity factors of *Vibrio vulnificus*: A review. Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya. 2022;30(6):59-65. DOI: 10.35627/2219-5238/2022-30-6-59-65 (In Russian).
36. Whitfield C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. Annu Rev Biochem. 2006;75:39-68. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142545
37. Smith AB, Siebeling RJ. Identification of genetic loci required for capsular expression in *Vibrio vulnificus*. Infect Immun. 2003 Mar;71(3):1091-7. DOI: 10.1128/IAI.71.3.1091-1097.2003
38. Pettis GS, Mukerji AS. Structure, Function, and Regulation of the Essential Virulence Factor Capsular Polysaccharide of *Vibrio vulnificus*. Int J Mol Sci. 2020 May 5;21(9):3259. DOI: 10.3390/ijms21093259
39. Garrison-Schilling KL, Grau BL, McCarter KS, Olivier BJ, Comeaux NE, Pettis GS. Calcium promotes exopolysaccharide phase variation and biofilm formation of the resulting phase variants in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. Environ Microbiol. 2011 Mar;13(3):643-54. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02369.x
40. Chatzidaki-Livanis M, Jones MK, Wright AC. Genetic variation in the *Vibrio vulnificus* group 1 capsular polysaccharide operon. J Bacteriol. 2006 Mar;188(5):1987-98. DOI: 10.1128/JB.188.5.1987-1998.2006
41. Hilton T, Rosche T, Froelich B, Smith B, Oliver J. Capsular polysaccharide phase variation in *Vibrio vulnificus*. Appl Environ Microbiol. 2006 Nov;72(11):6986-93. DOI: 10.1128/AEM.00544-06
42. Gulig PA, Bourdage KL, Starks AM. Molecular Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. J Microbiol. 2005 Feb;43 Spec No:118-31.
43. Merkel SM, Alexander S, Zufall E, Oliver JD, Huet-Hudson YM. Essential role for estrogen in protection against *Vibrio vulnificus*-induced endotoxic shock. Infect Immun. 2001 Oct;69(10):6119-22. DOI: 10.1128/IAI.69.10.6119-6122.2001

44. Iguchi T, Kondo S, Hisatsune K. Sugar composition of the polysaccharide portion of lipopolysaccharides of *Vibrio fluvialis*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio mimicus*. Microbiol Immunol. 1989;33(10):833-41. DOI: 10.1111/j.1348-0421.1989.tb00969.x
45. Vinogradov E, Wilde C, Anderson EM, Nakhamchik A, Lam JS, Rowe-Magnus DA. Structure of the lipopolysaccharide core of *Vibrio vulnificus* type strain 27562. Carbohydr Res. 2009 Mar 10;344(4):484-90. DOI: 10.1016/j.carres.2008.12.017
46. Scaglione S, Kliethermes S, Cao G, Shoham D, Durazo R, Luke A, et al. The Epidemiology of Cirrhosis in the United States: A Population-based Study. J Clin Gastroenterol. 2015 Sep;49(8):690-6. DOI: 10.1097/MCG.0000000000000208
47. Thiaville PC, Bourdage KL, Wright AC, Farrell-Evans M, Garvan CW, Gulig PA. Genotype is correlated with but does not predict virulence of *Vibrio vulnificus* biotype 1 in subcutaneously inoculated, iron dextran-treated mice. Infect Immun. 2011 Mar;79(3):1194-207. DOI: 10.1128/IAI.01031-10
48. Miyamoto K, Kawano H, Okai N, Hiromoto T, Miyano N, Tomoo K, et al. Iron-Utilization System in *Vibrio vulnificus* M2799. Mar Drugs. 2021 Dec 17;19(12):710. DOI: 10.3390/md19120710
49. Okujo N, Saito M, Yamamoto S, Yoshida T, Miyoshi S, Shinoda S. Structure of vulnibactin, a new polyamine-containing siderophore from *Vibrio vulnificus*. Biometals. 1994 Apr;7(2):109-16. DOI: 10.1007/BF00140480
50. Stelma GN Jr, Reyes AL, Peeler JT, Johnson CH, Spaulding PL. Virulence characteristics of clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus*. Appl Environ Microbiol. 1992 Sep;58(9):2776-82. DOI: 10.1128/aem.58.9.2776-2782.1992
51. Duong-Nu TM, Jeong K, Hong SH, Puth S, Kim SY, Tan W, et al. A stealth adhesion factor contributes to *Vibrio vulnificus* pathogenicity: Flp pili play roles in host invasion, survival in the blood stream and resistance to complement activation. PLoS Pathog. 2019 Aug 22;15(8):e1007767. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007767
52. Lee S, Song S, Lee K. Functional analysis of TolC homologs in *Vibrio vulnificus*. Curr Microbiol. 2014 Jun;68(6):729-34. DOI: 10.1007/s00284-014-0537-4
53. Natividad-Bonifacio I, Fernández FJ, Quiñones-Ramírez EI, Curiel-Quesada E, Vázquez-Salinas C. Presence of virulence markers in environmental *Vibrio vulnificus* strains. J Appl Microbiol. 2013 May;114(5):1539-46. DOI: 10.1111/jam.12149
54. Bogard RW, Oliver JD. Role of iron in human serum resistance of the clinical and environmental *Vibrio vulnificus* genotypes. Appl Environ Microbiol. 2007 Dec;73(23):7501-5. Erratum in: Appl Environ Microbiol. 2008 May;74(10):3322. DOI: 10.1128/AEM.01551-07
55. Elgaml A, Higaki K, Miyoshi S. Effects of temperature, growth phase and luxO-disruption on regulation systems of toxin production in *Vibrio vulnificus* strain L-180, a human clinical isolate. World J Microbiol Biotechnol. 2014 Feb;30(2):681-91. DOI: 10.1007/s11274-013-1501-3
56. Bang YB, Lee SE, Rhee JH, Choi SH. Evidence that expression of the *Vibrio vulnificus* hemolysin gene is dependent on cyclic AMP and cyclic AMP receptor protein. J Bacteriol. 1999 Dec;181(24):7639-42. DOI: 10.1128/JB.181.24.7639-7642.1999
57. Liu M, Crosa JH. The regulator HlyU, the repeat-in-toxin gene rtxA1, and their roles in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections. Microbiologyopen. 2012 Dec;1(4):502-13. DOI: 10.1002/mbo3.48
58. Kim WB, Lee BC, Choi SH. *Vibrio vulnificus* AphB is involved in interleukin-8 production via an NF- κ B-dependent pathway in human intestinal epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Jan 27;417(4):1265-70. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.12.122
59. Carda-Diéguez M, Silva-Hernández FX, Hubbard TP, Chao MC, Waldor MK, Amaro C. Comprehensive identification of *Vibrio vulnificus* genes required for growth in human serum. Virulence. 2018 Dec 31;9(1):981-993. DOI: 10.1080/21505594.2018.1455464
60. Coerd KM, Khachemoune A. *Vibrio vulnificus*: Review of Mild to Life-threatening Skin Infections. Cutis. 2021 Feb;107(2):E12-E17. DOI: 10.12788/cutis.0183
61. Yin JF, Wang MY, Chen YJ, Yin HQ, Wang Y, Lin MQ, et al. Direct Detection of *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio alginolyticus* from Clinical and Environmental Samples by a Multiplex Touchdown Polymerase Chain Reaction Assay. Surg Infect (Larchmt). 2018 Jan;19(1):48-53. DOI: 10.1089/sur.2017.203
62. D'Souza C, Kumar BK, Rai P, Deekshit VK, Karunasagar I. Application of *gyrB* targeted SYBR green based qPCR assay for the specific and rapid detection of *Vibrio vulnificus* in seafood. J Microbiol Methods. 2019 Nov;166:105747. DOI: 10.1016/j.mimet.2019.105747
63. Çam S, Brinkmeyer R, Schwarz JR. Quantitative PCR enumeration of *vcrC* and 16S rRNA type A and B genes as virulence indicators for environmental and clinical strains of *Vibrio vulnificus* in Galveston Bay oysters. Can J Microbiol. 2019 Aug;65(8):613-621. DOI: 10.1139/cjm-2018-0399
64. Kim HJ, Cho JC. Genotypic Diversity and Population Structure of *Vibrio vulnificus* Strains Isolated in Taiwan and Korea as Determined by Multilocus Sequence Typing. PLoS One. 2015 Nov 23;10(11):e0142657. DOI: 10.1371/journal.pone.0142657
65. Pan J, Zhang Y, Jin D, Ding G, Luo Y, Zhang J, et al. Molecular characterization and antibiotic susceptibility of *Vibrio vulnificus* in retail shrimps in Hangzhou, People's Republic of China. J Food Prot. 2013 Dec;76(12):2063-8. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-13-161
66. Raz N, Danin-Poleg Y, Hayman RB, Bar-On Y, Linetsky A, Shmoish M, et al. Genome-wide SNP-genotyping array to study the evolution of the human pathogen *Vibrio vulnificus* biotype 3. PLoS One. 2014 Dec 19;9(12):e114576. DOI: 10.1371/journal.pone.0114576
67. Chatzidaki-Livanis M, Jones MK, Wright AC. Genetic variation in the *Vibrio vulnificus* group 1 capsular polysaccharide operon. J Bacteriol. 2006 Mar;188(5):1987-98. DOI: 10.1128/JB.188.5.1987-1998.2006

Информация о соавторах:

Писанов Руслан Вячеславович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института

Ступникова Елена Вадимовна, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института
ORCID: 0000-0002-9574-9684

Information about co-authors:

Ruslan V. Pisanov, PhD in Biological Sciences, Leading researcher, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections of the Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute, Rospotrebnadzor

Elena V. Stupnikova, Researcher, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections of the Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute, Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-9574-9684

Оценка состояния профессиональной подготовки для снижения биологических рисков у сотрудников ветеринарных испытательных лабораторий

Е.А.Тюрин¹, С.А.Благодатских¹, П.С.Квочко²

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

²ГБУ ветеринарии Московской области «Территориальное ветеринарное управление №4», Видное, Московская область, Российская Федерация

В статье рассматривается связь уровня профессиональной подготовки специалистов и их безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА). Также затрагиваются аспекты преподавания и проверки знаний по теме «биобезопасность». На основании этого делается заключение о необходимости увеличения специалистов в сфере биобезопасности и создания нормативных документов, регламентирующих риски возникновения аварий с ПБА.

Ключевые слова: биологическая безопасность, биологический риск, профессиональная подготовка, биологическая авария, инфицирование, приемы безопасной работы

Для цитирования: Тюрин Е.А., Благодатских С.А., Квочко П.С. Оценка состояния профессиональной подготовки для снижения биологических рисков у сотрудников ветеринарных испытательных лабораторий. Бактериология. 2023; 8(2): 79–82. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-79-82

Assessment of the state of professional training to reduce biological risks in staff of veterinary testing laboratories

E.A.Tyurin¹, S.A.Blagodatskikh¹, P.S.Kvochko²

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

²GBU of Veterinary Medicine of the Moscow Region «Territorial Veterinary Administration No 4», Moscow Region, Vidnoe, Russian Federation

The article discusses the correlation between the level of professional training of specialists and their safe work with biohazardous agents. It also addresses aspects of teaching and assessing knowledge on the topic of biosafety. Based on this, a conclusion is drawn about the need to increase specialists in the field of «biosafety» and the necessity of creating regulatory documents regulating the risks of accidents involving biohazardous agents.

Key words: biological safety, biological risk, professional training, biological accident, infection, methods of safe work

For citation: Tyurin E.A., Blagodatskikh S.A., Kvochko P.S. Assessment of the state of professional training to reduce biological risks in staff of veterinary testing laboratories Bacteriology. 2023; 8(2): 79–82. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-79-82

Для корреспонденции:

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

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

Телефон: (4967) 360-016

E-mail: turin@obolensk.org

Статья поступила 13.04.2023, принята к печати 30.06.2023

For correspondence:

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

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, 142279, Russian Federation

Phone: (4967) 360-016

E-mail: turin@obolensk.org

The article was received 13.04.2023, accepted for publication 30.06.2023

Профессионализм сотрудников ветеринарной испытательной лаборатории в сфере работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) складывается из теоретических знаний и приобретенных практических навыков. Наиболее важным фактором для снижения профессионального риска при работе с ПБА является грамотный подбор специалистов для выполнения задач, стоящих перед сотрудниками в таких лабораториях. Другим фактором является совершенствование практических навыков в процессе трудовой деятельности на рабочем месте и на курсах повышения квалификации в дальнейшем. Основой работы лаборатории является пакет нормативно-методической и разрешительной документации, в т.ч. полученные необходимые лицензии и санитарно-эпидемиологические заключения, инструкции, санитарные правила, методические рекомендации и указания [1]. Немаловажным для биологически безопасной лаборатории является оснащение надежными инженерно-техническими системами биологической безопасности и средствами защиты, охранной, пожарной и аварийной сигнализации. Весь персонал лаборатории должен проходить аттестацию после курсов усовершенствования, специализации и переподготовки, соответствующих профилю работ в данной лаборатории. Все это регламентируется набором нормативно-методических (инструкции, санитарные правила, методические рекомендации и указания) и разрешительных документов (лицензии на работу с ПБА и соответствующие санитарно-эпидемиологические заключения) [1].

В соответствии с действующими нормативными документами сотрудников допускают к работам с ПБА, если у них есть высшее или среднее медицинское, или биологическое, или ветеринарное, или микробиологическое, или биотехнологическое, или пищевое профессиональное образование и дополнительная подготовка по специальностям, отвечающим требованиям и характеру заявленных работ [1]. Если у вновь прибывших сотрудников или при изменении профиля работы сотрудников нет дополнительной подготовки для работы с ПБА согласно поставленным задачам, они должны быть направлены на ее прохождение в возможно более короткие сроки. Допуск оформляется приказом директора учреждения или организации сроком максимум на два года, с возможностью его переоформления под текущие задачи организации.

Сотрудники должны не иметь медицинских противопоказаний к специфической вакцинации и лечению специфическими препаратами, а также к работе в средствах индивидуальной защиты органов дыхания. У сотрудников не должно быть психических отклонений, так как человеческий фактор играет ведущую роль в обеспечении положений и требований биологической безопасности при работе в лаборатории [2]. Желательно направлять на профессиональную подготовку сотрудников лаборатории как можно быстрее после приема на работу и, соответственно, проводить первичную профессиональную оценку возможного использования того или иного специалиста на занимаемой должности [1].

На наш взгляд, биологическая безопасность обеспечивается не только путем реализации комплекса медико-биологических, организационных и инженерно-технических мероприятий, направленных на эффективное снижение рисков и угроз биологического характера, но и высокой квалифика-

цией сотрудников как в профессиональной области, так и в области биологической безопасности, что достигается путем повышения уровня профессиональных знаний в течение всей трудовой деятельности. Однако первичную профессиональную подготовку по теории и практике с основами биологической безопасности для работ с ПБА II–IV групп для сотрудников ветеринарных лабораторий проводят не во всех организациях, имеющих право на оказание такой услуги.

Целью настоящего исследования являлся анализ подготовленности сотрудников испытательных ветеринарных лабораторий для проведения различных профессиональных исследований и их действий при ликвидации аварийных ситуаций и аварий, которые могут произойти в лаборатории во время работы с микроорганизмами.

Опыт наших специалистов лаборатории биологической безопасности показывает, что у сотрудников, допущенных к работам с микроорганизмами I–IV групп патогенности (опасности), со временем притупляется чувство опасности [3, 4]. Теоретические знания по соблюдению требований биологической безопасности у таких сотрудников обычно оцениваются на 4–5 баллов, но практические знания – 3–4 балла из 5. Также очень интересные данные показал анализ знаний у сотрудников, не имеющих курсов специализации по работе с ПБА II–IV групп в испытательных ветеринарных лабораториях, но имеющих опыт работы в лаборатории более 3 лет. Такие сотрудники не имеют четких представлений о последствиях при нарушениях требований биологической безопасности.

Одним из наиболее важных факторов безопасной работы в лаборатории является уровень владения профессиональными практическими и теоретическими знаниями о возможных источниках и механизмах заражения сотрудников при работе с ПБА [3, 4]. Для поддержания на высоком уровне таких знаний необходимо проводить теоретические и практические занятия по ликвидации последствий аварий, курсы повышения квалификации с освоением практических навыков работы с ПБА и последующей проверкой усвоения знаний по биологической безопасности.

Один из важных компонентов любых курсов – это их актуальность и современность информационного материала. Курсы должны содержать последние требования по соблюдению и контролю требований биологической безопасности, в материалах таких курсов должны быть отражены не только теоретические, но и практические новые методы исследований, они должны давать представление о новом оборудовании.

Весь комплекс современных мер, направленных на уменьшение риска предотвращения случаев лабораторного заражения, в целом справляется с этой задачей, но полностью исключить риск невозможно [5, 6]. Для уменьшения такого риска все сотрудники ветеринарных лабораторий, допущенные к работам с материалами содержащих ПБА, должны всегда проходить первичную специализацию и в дальнейшем повышать свой опыт безопасной работы на специализируемых курсах практическими навыками работ.

При работах в лабораториях нужно учитывать три главных аспекта безопасной работы в биологическом плане:

- 1) инженерно-технические решения;
- 2) организационные и контрольные вопросы работ;
- 3) медико-биологические мероприятия.

В комплексе соблюдение этих аспектов способствует минимизации биологической опасности для персонала лаборатории и окружающей среды [7].

Благодаря большому опыту проведения занятий с сотрудниками учреждения нашими специалистами по биологической безопасности был разработан учебный курс для специалистов медико-биологического и ветеринарного профиля, содержащий следующие темы:

- новые нормативные документы, регламентирующие принципы биологической безопасности при работе с микроорганизмами в России и за рубежом;
- основные понятия биологической безопасности и защиты при работе с ПБА;
- рабочая и защитная одежда (современные требования к одежде и материалам для изготовления ее, правила надевания и снятия защитной одежды в лабораториях различных уровней безопасности);
- принципы управления биологическими рисками (что может произойти, какова вероятность этого события, насколько серьезны последствия события, какие меры следует предпринять, чтобы минимизировать последствия или избежать возможного события);
- принципы организации и структура лабораторией различных уровней биобезопасности (система ограждающих строительных конструкций; система приточной и вытяжной вентиляции с высокоэффективными фильтрами очистки воздуха; система боксов микробиологической безопасности и укрытий для работы с ПБА; система обеззараживания жидких отходов; система обеззараживания твердых отходов; система санитарных пропускников);
- медицинский контроль за сотрудниками, допущенными к работе с ПБА;
- принципы безопасной работы в боксах микробиологической безопасности (типы боксов, организация рабочего места в них, инженерное обслуживание боксов);
- принципы безопасной работы с животными (их опасность для персонала лаборатории, условия содержания, заражения, вскрытия);
- аварии, принципы планирования и реагирования на чрезвычайные ситуации;
- принципы управления биологическими отходами, классы отходов по эпидемической опасности (сбор, удаление и обеззараживание твердых и жидких отходов из лабораторий).

При разработке тем курса особое место уделялось такому понятию, как «авария». В нормативных документах указывается приблизительный список возможных аварий в подразделениях, работающих с ПБА [1, 8]. Источником «будущей аварии» может быть любой материал в лаборатории, содержащий ПБА, это может быть контрольная культура микроорганизмов, материалы, взятые для исследования на наличие ПБА. Сама авария может произойти по совокупности различных факторов: от зависящих от сотрудников до сторонних. По этой причине создание универсальных алгоритмов по недопущению и ликвидации аварии создать невозможно. Отсюда следует важность проведения практических занятий по недопущению и ликвидации аварии с конкретными сотрудниками и на их рабочих местах.

Все эти темы были отражены в лекционных материалах, представленных в онлайн-презентациях: «Обеспечение требований биологической безопасности при проведении работ с биологическим материалом» и «Прикладные аспекты биологической безопасности при проведении работ с ПБА II–IV групп в микробиологической ветеринарной лаборатории». Данные лекции были прочитаны на курсах повышения квалификации для специалистов ветеринарного профиля.

Для проверки знаний к этому курсу были разработаны тестовые задания: на один вопрос несколько вариантов ответа, один из которых верный. Всего было создано 50 вопросов для научных сотрудников (врачей) и 30 вопросов для лаборантов/инженеров. Для научных сотрудников (врачей) вопросы в основном затрагивали организационные и контрольные вопросы, а для лаборантов (инженеров) – практическую сторону вопроса.

В результате проведения тестирования по теме курса было установлено, что с теоретическими вопросами специалисты справляются в среднем на «хорошо», но знания по практическим навыкам безопасной работы в среднем показывали результат «удовлетворительно». Это говорит о том, что нужно увеличивать практические тренинги с моделированием текущих работ, аварийных ситуаций и других задач, поставленных перед подразделениями. Также нужно разделять такие занятия для специалистов среднего и высшего звена.

С другой стороны, нужно четко представлять, что такое «биологические риски», и уметь их определять для безопасной работы с ПБА [9, 10]. Хотя в России предпринимаются различные меры по снижению рисков неблагоприятных факторов на рабочих местах для здоровья работников [11, 12], но методологии для оценки биорисков, в полном размере отвечающей современным требованиям, до сих пор нет. Причиной этого является сам подход к оценке рисков: так, для химических и физических факторов оценку проводят, используя гигиенические критерии, отражающие степень изменения параметров факторов рабочей среды и трудового процесса в зависимости от существующих гигиенических нормативов. Но такой подход невозможен для оценки рисков при работе с ПБА. Часто отсутствуют установленные стандарты и процедуры для получения точных численных значений при обнаружении, идентификации и количественном определении микроорганизмов в окружающей среде.

Так как развитие и распространение инфекционных процессов в окружающей среде является многофакторным процессом, то его математическое моделирование является очень приблизительным и почти не используется.

На основании вышесказанного условия труда персонала, работающего с ПБА, оцениваются без измерений, а только благодаря классификации микроорганизмов, по их способности вызывать те или иные заболевания у людей.

В России на протяжении 90 лет действует и постоянно совершенствуется нормативная база, включающая в себя различные санитарные правила, методические и другие акты, являющаяся обязательной к исполнению при работе с ПБА [13].

На основании всего вышесказанного необходимо проводить научно-практические исследования, которые позволят правильно оценивать биологические риски при работе с ПБА, создать методики по уменьшению их в научных и про-

мышленных отраслях, а также стандарты по управлению рисками. Другой аспект биобезопасной работы – это наличие в достаточном количестве кадров, способных правильно оценивать риски при работе с ПБА, при этом их деятельность должна быть обеспечена правовыми документами.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was supported by the Sectoral Scientific 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. Санитарные нормы и правила «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» Сан Пин 3.3686-21. 2021.
2. Тюрин ЕА. Факторы биологической безопасности. Биозащита и биобезопасность. 2010;2(3):34-39.
3. Тюрин ЕА, Низова АВ, Чекан ЛВ, Потапов ВД, Дятлов ИА. Повышение качества профессиональной подготовки персонала для работ с возбудителями инфекционных заболеваний I–IV групп патогенности в области биологической безопасности. Национальные приоритеты России. 2014;3(13):165-167.
4. Тюрин ЕА, Чекан ЛВ. Условия соблюдения требований биологической безопасности при проведении работ с микроорганизмами II–IV групп патогенности в ветеринарных лабораториях. Ветеринария. 2021;2:14-19. DOI: 10.30896/0042-4846.2021.24.2.14-19
5. Pike RM. Laboratory-associated infections: summary and analysis of 3921 cases. Health Lab Sci. 1976 Apr;13(2):105-14. PMID: 946794.
6. Тюрин ЕА, Шкуров АА. Случай внутрилабораторного заражения сапом. Материалы юбилейной научно-практической конференции, посвященной 90-летию со дня основания Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н.Блохиной, «Научное обоснование противозидемической защиты населения». Нижний Новгород, 2009; 111-112.
7. Тюрин ЕА, Большан ИЕ, Чекан ЛВ, Гвазав КР, Артеменко ЕВ. Алгоритм мониторинга соблюдения требований биологической безопасности в лабораториях различного уровня защиты ветеринарной практики. Бактериология. 2021;6(1):32-36. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-1-32-36
8. Биологическая безопасность. Термины и определения. Под ред. Онищенко ГГ, Кутырева ВВ. 2-е изд., испр. и доп. М.: Медицина; 2011; 152.
9. Руководство по биобезопасности в лаборатории. 4-е изд. Laboratory Biosafety Manual. Geneva: World Health Organization, 2020.
10. Биобезопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях. 6-е изд. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. CDC. 2020.
11. Федеральный закон «О техническом регулировании» от 27 декабря 2002 г. №184-ФЗ.
12. Постановление №13. Президиум российской Академии медицинских наук «О реализации в системе Госсанэпиднадзора России концепции оценки риска неблагоприятных факторов окружающей среды на здоровье населения России», 29 января 2003 г., протокол №2, §2.
13. Дятлов ИА, Тюрин ЕА. Государственная санитарно-эпидемиологическая служба в обеспечении биологической безопасности. Здравоохранение Российской Федерации. 2013;2:31-35.

References

1. Sanitarnye normy i pravila «Sanitarno-epidemiologicheskie trebovaniya po profilaktike infektsionnykh boleznei» SaN PiN 3.3686-21. 2021. (In Russian).
2. Tyurin EA. Faktory biologicheskoi bezopasnosti. Biozashchita i biobezopasnost'. 2010;2(3):34-39. (In Russian).
3. Tyurin EA, Nizova AV, Chekan LV, Potapov VD, Dyatlov IA. Improvement of vocational training quality of personnel working with causative agents of infectious diseases of groups I–IV in the field of biological safety. Natsional'nye prioritety Rossii. 2014;3(13):165-167. (In Russian).
4. Tyurin EA, Chekan LV. Conditions of compliance with biological safety requirements in the work with microorganisms II–IV pathogenic groups in veterinary laboratories. J. Veterinariya. 2021;2:14-9. DOI: 10.30896/0042-4846.2021.24.2.14-19 (In Russian).
5. Pike RM. Laboratory-associated infections: summary and analysis of 3921 cases. Health Lab Sci. 1976 Apr;13(2):105-14. PMID: 946794.
6. Tyurin EA, Shkurov AA. Sluchai vnutilaboratornogo zarazheniya sapom. Materialy yubileinoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi 90-letiyu so dnya osnovaniya Nizhegorodskogo NII epidemiologii i mikrobiologii im. akademika I.N.Blokhinoi, «Nauchnoe obosnovanie protivoepidemicheskoi zashchity naseleniya». Nizhnii Novgorod, 2009; 111-112. (In Russian).
7. Tyurin EA, Bol'shan IE, Chekan LV, Gvazava KR, Artemenko EV. Algorithm for monitoring compliance with biological safety in laboratories with various levels of veterinary practice protection. Bacteriology. 2021;6(1):32-36. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-1-32-36 (In Russian).
8. Biologicheskaya bezopasnost'. Terminy i opredeleniya. Pod red. Onishchenko GG, Kutyreva VV. 2-e izd., ispr. i dop. M.: «Meditsina» Publ.; 2011; 152. (In Russian).
9. Rukovodstvo po biobezopasnosti v laboratorii. 4-e izd. Laboratory Biosafety Manual. Geneva: World Health Organization, 2020. (In Russian).
10. Biobezopasnost' v mikrobiologicheskikh i biomeditsinskikh laboratoriyakh. 6-e izd. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. CDC. 2020. (In Russian).
11. Federal'nyi zakon «O tekhnicheskoy regulirovani» ot 27 dekabrya 2002 g. №184-FZ. (In Russian).
12. Postanovlenie №13. Prezidium rossiiskoi Akademii meditsinskikh nauk «O realizatsii v sisteme Gossanepidnadzora Rossii kontseptsii otsenki riska neblagopriyatnykh faktorov okruzhayushchei sredy na zdorov'e naseleniya Rossii», 29 yanvarya 2003 g., protokol №2, §2. (In Russian).
13. Dyatlov IA, Tyurin EA. Gosudarstvennaya sanitarno-epidemiologicheskaya sluzhba v obespechenii biologicheskoy bezopasnosti. Health Care of the Russian Federation. 2013;2:31-35. (In Russian).

Информация о соавторе:

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

Квачко Пётр Степанович, начальник ГБУ ветеринарии Московской области «Территориальное ветеринарное управление №4»

Information about co-author:

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

Petr S. Kvachko, head of the GBU of Veterinary Medicine of the Moscow Region «Territorial Veterinary Administration No 4»

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

Тел. (4967) 36-00-46
Факс (4967) 36-00-10

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

Подписку на журналы Издательства «Династия» можно оформить:

В любом почтовом отделении России по объединенному каталогу «Пресса России»

Вопросы практической педиатрии	Индекс: 87946	Инфекционные болезни	Индекс: 12919
Вопросы детской диетологии	Индекс: 12917	Вопросы диетологии	Индекс: 90955
Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии	Индекс: 12916	Вопросы урологии и андрологии	Индекс: 91823

Через альтернативные подписные издательства

ООО «Информнаука» – www.informnauka.com; ООО «Урал-Пресса» – www.ural-press.ru

Через сайт издательства www.phdynasty.ru для физических лиц
и через издательство для юридических лиц
с любого номера текущего года на любой период

Наименование журнала	Для физических лиц		Для юридических лиц	
	руб./полугодие	руб./год	руб./полугодие	руб./год
Вопросы практической педиатрии	1380	2760	2070	4140
Вопросы детской диетологии	1380	2760	2070	4140
Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии	1380	2760	2070	4140
Инфекционные болезни	920	1840	1380	2760
Вопросы диетологии	920	1840	1380	2760
Вопросы урологии и андрологии	920	1840	1380	2760

ВНИМАНИЕ!

Для выставления счета юридическим лицам достаточно прислать заявку по e-mail: podpiska@phdynasty.ru

В заявке необходимо обязательно указать реквизиты организации, название журнала, период подписки, контактный телефон, e-mail и ответственное лицо.

Адрес: 119019, Москва, Г-19, а/я 229, тел./факс: (495) 660-6004
e-mail: podpiska@phdynasty.ru, www.phdynasty.ru