

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2023 • ТОМ 8 • №3

ISSN 2500-1027

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Научно - практический журнал

Главный редактор

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

Ответственный секретарь

И.Г.Говорунов, к.б.н.
(Россия)

Редакционный совет

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

Редколлегия

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

Учредитель

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

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

Адрес учредителя и редакции:

142279, Московская область,
г.о. Серпухов, р.п. Оболensk,
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 29.09.2023 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
ПИ №ФС 77-66792 от 15.08.2016 г.

Журнал «Бактериология»
является рецензируемым изданием.

Выходит четыре раза в год.
Основан в 2016 году.

Редакция не несет ответственности
за содержание рекламных материалов.

Тираж 1530 экз. Цена свободная.

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

Подписной индекс по объединенному
каталогу «Пресса России»: 39920

Колонка главного редактора

- VIII Национальный конгресс бактериологов и общее собрание членов Ассоциации «Национальное научно-практическое общество бактериологов» – в русле нового этапа развития бактериологической науки и практики **5**

Экспериментальные статьи

- Доклиническое изучение эффективности и безопасности пробиотических штаммов *Lactobacillus* spp. для профилактики инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта, в том числе ассоциированных с постковидным синдромом
А.И.Лаишевцев, П.А.Вьюшинский, В.А.Савинов, П.Н.Шагин, А.В.Хабарова, Э.А.Якимова, А.В.Капустин, А.В.Супова, Е.Г.Ежова, М.Д.Белкова, И.А.Киселёва, Е.С.Зубкова, М.А.Пасивкина, М.Н.Анурова, О.Г.Жиленкова, А.В.Алёшкин. **7**
- Разработка способа капсулирования симбиотических бактерий
В.Д.Похиленко, И.А.Дунайцев, Т.А.Калмантаев, В.П.Левчук, А.Н.Сомов, И.А.Чукина **16**
- Эколого-токсикологическая оценка воздействия компонентов ракетных топлив (диметилгидразина и авиационного керосина) на объекты окружающей среды
Г.А.Жариков, А.И.Марченко, О.А.Крайнова **26**
- Стерилизация препаратов бактериальных теней *Yersinia pestis*
Е.М.Мазурина, Е.А.Бурмистров, Н.Ю.Буданова, А.С.Вагайская, А.С.Трунякова, Т.И.Комбарова, С.А.Иванов, И.А.Дунайцев, С.В.Дентовская, А.П.Анисимов. **36**
- База данных «Генетические детерминанты вирулентности и устойчивости к антимикотикам клинических штаммов *Candida* spp.»
Е.А.Горемыкина, П.В.Слукин, О.Е.Хохлова, Н.К.Фурсова **41**
- Разработка дуплексной петлевой изотермической амплификации LAMP для детекции *Listeria monocytogenes*
А.Г.Шевяков, И.Ю.Щит, В.Н.Борзенков, С.Ф.Бикетов, С.С.Ветчинин **48**
- Алгоритм разработки и характеристика диагностических латексных тест-систем, производимых в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии (часть 2)
Э.А.Светоч, Б.В.Ерусланов, И.П.Мицевич, М.В.Храмов, Е.С.Перескокова, Н.Н.Карцев, Н.К.Фурсова **56**
- Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Francisella tularensis*, выделенных во время эпизоотии 2022–2023 гг. в Ростовской области и Донецкой Народной Республике
В.М.Сорокин, Н.В.Павлович, М.В.Цимбалистова, А.С.Водопьянов, Р.В.Писанов, А.К.Носков **68**
- Получение и оценка качества полирибозилрибитолфосфата *Haemophilus influenzae* типа b – основного компонента вакцины против гемофильной инфекции
С.В.Коробова, П.А.Стряхнин, И.Ю.Курбатова, И.А.Казаков, Н.А.Разваляева, И.В.Анкудинов, Т.В.Ганчо, В.А.Ледов, П.Г.Апарин. **75**

Обзорные статьи

- Почвенные очаги и влияние компонентов биоты почвы на возбудителя сибирской язвы
Л.И.Маринин, Н.А.Шишкова, Е.А.Тюрин, А.Н.Мокриевич, И.А.Дятлов, А.Ф.Шуляк **83**
- Освоение промышленного производства набора менингококковых диагностических сывороток
Т.Ю.Гашенко, С.Г.Марданлы, Э.А.Мамедова **92**
- Материалы VIII Национального конгресса бактериологов (дополнение) **98**
- Правила оформления статей (основные положения) **101**

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

VIII National Congress of Bacteriologists and the general meeting of members of the Association of the National Scientific and Practical Society of Bacteriologists – in line with a new stage in the development of bacteriological science and practice	5
---	---

Experimental Articles

Preclinical study of the efficacy and safety of probiotic strains of <i>Lactobacillus</i> spp. with emphasis on combating and preventing gastrointestinal diseases during long-term COVID-19 <i>A.I.Laishevtsev, P.A.Vyushinsky, V.A.Savinov, P.N.Shastin, A.V.Khabarova, E.A.Yakimova, A.V.Kapustin, A.V.Supova, E.G.Ezhova, M.D.Belkova, I.A.Kiseleva, E.S.Zubkova, M.A.Pasivkina, M.N.Anurova, O.G.Zhilenkova, A.V.Aleshkin</i>	7
Development of a method for symbiotic bacteria encapsulation <i>V.D.Pokhilenko, I.A.Dunaytsev, T.A.Kalmantaev, V.P.Levchuk, A.N.Somov, I.A.Chukina</i>	16
Environmental and toxicological assessment of the impact of rocket fuel components (dimethylhydrazine and aviation kerosine) on environmental objects <i>G.A.Zharikov, A.I.Marchenko, O.A.Krainova</i>	26
Sterilization of <i>Yersinia pestis</i> bacterial ghost preparations <i>E.M.Mazurina, E.A.Burmistrov, N.Yu.Budanova, A.S.Vagaikaya, A.S.Trunyakova, T.I.Kombarova, S.A.Ivanov, I.A.Dunaytsev, S.V.Dentovskaya, A.P.Anisimov</i>	36
The database «Genetical determinants of virulence and antimicrobial resistance in clinical <i>Candida</i> spp. strains» <i>E.A.Goremykina, P.V.Slukin, O.E.Khokhlova, N.K.Fursova</i>	41
Development of duplex loop isothermal LAMP amplification for the detection of <i>Listeria monocytogenes</i> <i>A.G.Shevyakov, I.Yu.Shchit, V.N.Borzenkov, S.F.Biketov, S.S.Vetchinin</i>	48
The algorithm for development and characterization of diagnostic latex test-systems producing at the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology (part 2) <i>E.A.Svetoch, B.V.Eruslanov, I.P.Mitsevich, M.V.Khramov, E.S.Pereskokova, N.N.Kartsev, N.K.Fursova</i>	56
Molecular genetic characteristics of <i>Francisella tularensis</i> strains during the 2022–2023 epizooty in the Rostov region and the Donetsk People's Republic <i>V.M.Sorokin, N.V.Pavlovich, M.V.Tsimbalistova, A.S.Vodopyanov, R.V.Pisanov, A.K.Noskov</i>	68
Development and quality evaluation of the <i>Haemophilus influenzae</i> type b polyribozyl-ribitol-phosphate: the main component of the vaccine against hemophilian infection <i>S.V.Korobova, P.A.Stryakhnin, I.Yu.Kurbatova, I.A.Kazakov, N.A.Razvalyayeva, I.V.Ankudinov, T.V.Gancho, V.A.Ledov, P.G.Aparin</i>	75

Review Articles

Influence of soil biota components on the anthrax pathogen <i>L.I.Marinin, N.A.Shishkova, E.A.Tyurin, A.N.Mokrievich, I.A.Dyatlov, A.F.Shulyak</i>	83
Mastering the industrial production of a set of meningococcal diagnostic serums <i>T.Yu.Gashenko, S.H.Mardanly, E.A.Mamedova</i>	92
Proceedings of the VIII National Congress of Bacteriologists (supplement)	98
Instructions for Authors	101

VIII Национальный конгресс бактериологов и общее собрание членов Ассоциации «Национальное научно-практическое общество бактериологов» – в русле нового этапа развития бактериологической науки и практики

В период с 27 по 28 сентября 2023 г. в Москве состоялся очередной VIII Национальный конгресс бактериологов. На открытии в адрес Конгресса прозвучали приветственные слова от руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека – Главного государственного санитарного врача Российской Федерации, доктора медицинских наук, профессора Поповой Анны Юрьевны.

Конгресс состоялся в очном формате, в его работе приняли 449 человек со всех регионов России: научные работники в области клинической и санитарной микробиологии, биотехнологии, эпидемиологии, специалисты Роспотребнадзора, преподаватели высших учебных заведений, работники практического здравоохранения.

Научная программа Конгресса включала пленарное и девять секционных заседаний. Вниманию слушателей было представлено 67 докладов. В пленарной части форума был представлен доклад И.А.Дятлова «Биологические риски, связанные с распространением факторов патогенности и резистентности возбудителей болезней человека», раскрывающий наиболее актуальную на сегодняшний день тематику в области биологической безопасности, связанную с выявлением и оценкой значимости появления у возбудителей инфекционных заболеваний новых генов и генетических элементов, определяющих типы повреждений организма и нарушений иммунной системы, вызванных факторами патогенности микроорганизмов. Тезисы доклада будут представлены в колонке главного редактора в следующем номере журнала. Кроме того, были представлены доклады: «Микробиом – двуликий Янус: источник фармакологических ингредиентов и резервуар генов лекарственной устойчивости» (д.б.н. Даниленко В.Н.), «Время принятия микробиологических решений» (чл.-корр. РАН Припутневич Т.В.), «Федеральный научно-методический центр по изучению и идентификации бактериофагов – итоги первых пяти лет» (чл.-корр. РАН Алёшкин А.В.), «Бактерии и антибиотики: что кроме резистентности?» (чл.-корр. РАН Сидоренко С.В.), «Перспективы рациональной интеграции геномного компонента в систему государственного санитарно-эпидемиологического надзора в Российской Федерации» (д.м.н. Подколзин А.Т.). Данные доклады представлены на сайте конгресса, и мы надеемся на их полное опубликование в журнале «Бактериология».

Секция под руководством акад. РАН Габибова А.Г. и д.м.н. Фирстовой В.В. была посвящена развитию генетических технологий для создания инновационных средств профилактики, лечения и диагностики инфекционных болезней. В ней речь шла об использовании подходов комбинаторной химии и биологии в исследовании иммунного ландшафта (докладчик акад. РАН Габибов А.Г.); о конструировании современных бактериальных вакцин на различных платформах (д.м.н. Анисимов А.П.); о получении и очистке фаговых эндолизимов стафилококков, обладающих уникальными свойствами разрушать бактериальную клеточную стенку, что делает их идеальными кандидатами для создания новых классов антимикробных препаратов против возбудителей инфекций с множественной лекарственной устойчивостью (к.м.н. Абаев И.В.). Доклады д.м.н. Фирстовой В.В. и д.б.н. Воробьёва И.И. были посвящены анализу способов создания человеческих моноклональных антител, способных нейтрализовать вирусы и токсины, и продуцентов моноклональных антител в клетках СНО.



На секции «Развитие культуральных методов исследования для практической медицинской микробиологии» (докладчики д.м.н. Борисова О.Ю., к.м.н. Храмов М.В., к.х.н. Домотенко Л.В., к.б.н. Полосенко О.В., к.б.н. Подкопаев Я.В., к.м.н. Пименова А.С.) были рассмотрены современные аспекты использования культуральных методов исследования в лабораторной диагностике инфекций и при контроле качества и безопасности пищевых продуктов, воды, кормов для животных.

На секционном заседании «Современные технологии в работе микробиологических лабораторий» (модераторы д.м.н. Кафтырева Л.А. и д.м.н. Маматкулов И.Х.) рассмотрены вопросы внедрения молекулярно-биологических методов исследования (мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией, OMICs-технологий и др.) для расширения аналитических и диагностических возможностей лабораторной диагностики инфекционных болезней, а также для детекции всех патогрупп диареогенных эшерихий и нового возбудителя пищевых вспышек – монофазной *Salmonella Typhimurium*, при расследовании вспышки эшерихиоза с гематуремическим синдромом и при уточнении этиологии внебольничных пневмоний в период пандемии новой коронавирусной инфекции и др.

Существенное внимание на Конгрессе было уделено обсуждению проблемы устойчивости патогенов к антибиотикам и дезинфектантам как одной из наиболее серьезных угроз для здоровья человечества и продовольственной безопасности. В рамках двух секций (модераторы д.м.н. Яковлев С.В., д.м.н. Базиков И.А., д.б.н. Хохлова О.Е., к.б.н. Куликова Н.Г.) было заслушано 14 докладов, отражающих современные направления исследований в данной области.

Значительное внимание на тематических заседаниях (модераторы д.м.н. Исаева Г.Ш. и к.м.н. Альварес Фигероа М.В.) было уделено обсуждению современных тенденций в развитии технологий раннего выявления и идентификации возбудителей актуальных инфекций, включая общие для человека и животных (пневмонии, туберкулез, туляремия, лептоспироз, холера и др.).

В сфере санитарно-бактериологического контроля объектов окружающей среды и пищевых продуктов освещены вопросы, связанные с современным состоянием и перспективными направлениями исследований (секция под председательством д.м.н. Катаевой Л.В. и д.т.н. Юшиной Ю.К.).

В первый день проведения Конгресса состоялось очередное общее собрание членов Ассоциации «Национальное научно-практическое общество бактериологов», учредителями которой являются ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора и ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н.Блохиной» Роспотребнадзора. На собрании академик РАН, д.м.н., профессор, директор ФБУН ГНЦ ПМБ Дятлов И.А. был переизбран Президентом Ассоциации. Были вновь избраны: вице-президентом Ассоциации – академик РАН, д.м.н., профессор, директор Ставропольского научно-исследовательского противочумного института Куличенко А.Н.; исполнительным директором Ассоциации – д.б.н., доцент, главный научный сотрудник ФБУН ГНЦ ПМБ Хохлова О.Е. Также был утвержден новый состав Совета Ассоциации, включающий 16 ведущих специалистов – ученых членов Ассоциации; избрана Ревизионная комиссия; приняты и утверждены изменения и дополнения в Устав Ассоциации; приняты и утверждены изменения и дополнения в Положение о членстве в Ассоциации, утверждены формы заявлений физического и юридического лица о вступлении в члены Ассоциации.

Участники Конгресса и Ассоциации поддержали предложение о проведении в 2024 г. в Москве трехдневного Конгресса бактериологов, посвященного 50-летию Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора.

Оценивая результаты конгресса и общего собрания членов Ассоциации бактериологов, следует отметить, что мероприятия прошли на высоком уровне, программа VIII Национального конгресса бактериологов была насыщенной и интересной для специалистов различного уровня, привлекла внимание большое количество участников из системы Роспотребнадзора, практического здравоохранения, научных и учебных заведений.

VIII Национальный конгресс бактериологов предоставил возможность специалистам, работающим в данной области, передать друг другу накопленный опыт, сформировать новые направления исследований, которые будут способствовать существенному улучшению санитарно-эпидемиологической обстановки в стране.

Учитывая уровень проведенных мероприятий, а также тот факт, что журнал «Бактериология», как рупор Конгресса и Ассоциации, вошел в 2023 г. в перечень ВАК России по публикации рейтинговых статей, следует констатировать, что выбранная нами несколько лет назад стратегия поддержки и развития направления современной бактериологии оказалась верной и продуктивной.

*Главный редактор журнала «Бактериология»,
директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»,
академик РАН И.А.Дятлов*

Доклиническое изучение эффективности и безопасности пробиотических штаммов *Lactobacillus* spp. для профилактики инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта, в том числе ассоциированных с постковидным синдромом

А.И.Лаишевцев^{1,3}, П.А.Вьюшинский¹, В.А.Савинов¹, П.Н.Шагин¹, А.В.Хабарова¹, Э.А.Якимова¹,
А.В.Капустин¹, А.В.Супова¹, Е.Г.Ежова¹, М.Д.Белкова², И.А.Киселёва³, Е.С.Зубкова³,
М.А.Пасивкина³, М.Н.Анурова^{3,4}, О.Г.Жиленкова³, А.В.Алёшкин³

¹ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.Р.Коваленко РАН», Москва, Российская Федерация;

²ООО «Зеленые линии», Красногорск, Российская Федерация;

³ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация;

⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова (Сеченовский Университет), Институт фармации, Москва, Российская Федерация

В работе исследовано 58 кандидатных пробиотических штаммов *Lactobacillus* spp., выделенных из различных локусов человека и предназначенных для разработки и производства лекарственных средств и биологически активных добавок, направленных на профилактику ассоциированных с постковидным синдромом заболеваний, в т.ч. инфекционной этиологии, желудочно-кишечного тракта людей. Изучены следующие характеристики штаммов: антагонистическая активность в отношении тест-культур патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, токсигенность, токсичность, безвредность, вирулентность, дермонекротические свойства и показатель активности кислотообразования. Установлено, что 63,5% штаммов обладали высокой антагонистической активностью по отношению ко всем исследуемым тест-штаммам микроорганизмов; 25% лактобактерий имели низкую антагонистическую активность по отношению к 1–2 тест-штаммам, при этом к остальным тест-штаммам у них наблюдалась высокая антагонистическая активность; 11,5% лактобактерий обладали низкой антагонистической активностью по отношению к 3 и более тест-штаммам.

Токсигенны для лабораторных животных были 39 (70%) штаммов из 58, токсичны – 2 (3%). 17 прошедших испытания штаммов являлись безвредными, из них 5 штаммов оказались вирулентными при внутрибрюшинном введении. Таким образом, 12 штаммов лактобацилл полностью соответствовали требованиям, предъявляемым к производственным пробиотическим штаммам. При изучении активности кислотообразования было выявлено, что у данных штаммов этот показатель находился в диапазоне от $60 \pm 0,25$ до $260 \pm 1,42^\circ\text{T}$.

Ключевые слова: *Lactobacillus* spp., антагонистическая активность, токсигенность, токсичность, вирулентность, безвредность, активность кислотообразования, постковидный синдром

Для цитирования: Лаишевцев А.И., Вьюшинский П.А., Савинов В.А., Шагин П.Н., Хабарова А.В., Якимова Э.А., Капустин А.В., Супова А.В., Ежова Е.Г., Белкова М.Д., Киселёва И.А., Зубкова Е.С., Пасивкина М.А., Анурова М.Н., Жиленкова О.Г., Алёшкин А.В. Доклиническое изучение эффективности и безопасности пробиотических штаммов *Lactobacillus* spp. для профилактики инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта, в том числе ассоциированных с постковидным синдромом. Бактериология. 2023; 8(3): 7–15. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-7-15

Для корреспонденции:

Лаишевцев Алексей Иванович, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.Р.Коваленко РАН», заведующий лабораторией диагностики и контроля антибиотикорезистентности возбудителей наиболее клинически значимых инфекционных болезней ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора

Адрес: 109428, Москва, Рязанский пр-т, 24, корп. 1

Статья поступила 30.05.2023, принята к печати 29.09.2023

For correspondence:

Aleksey I. Laishevcev, PhD in Biological Sciences, Junior Researcher, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology of Bacteriophages, K.I.Skryabin and Ya.R.Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Sciences RAS; Head of the Laboratory for Diagnosis and Control of Antibiotic Resistance of Causative Agents of the Most Clinically Significant Infectious Diseases, FBIS «G.N.Gabrichesky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology» of Rosпотребнадзор

Address: 24, building 1 Ryazansky ave., Moscow, 109428, Russian Federation

The article was received 30.05.2023, accepted for publication 29.09.2023

Preclinical study of the efficacy and safety of probiotic strains of *Lactobacillus* spp. with emphasis on combating and preventing gastrointestinal diseases during long-term COVID-19

A.I.Laishevtsev^{1,3}, P.A.Vyushinsky¹, V.A.Savinov¹, P.N.Shastin¹, A.V.Khabarova¹, E.A.Yakimova¹, A.V.Kapustin¹, A.V.Supova¹, E.G.Ezhova¹, M.D.Belkova², I.A.Kiseleva³, E.S.Zubkova³, M.A.Pasivkina³, M.N.Anurova^{3,4}, O.G.Zhilenkova³, A.V.Aleshkin³

¹K.I.Skryabin and Ya.R.Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Sciences RAS, Moscow, Russian Federation;

²LLC «Green Lines», Krasnogorsk, Moscow, Russian Federation;

³G.N.Gabrichesky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor, Moscow, Russian Federation;

⁴I.M.Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

The work examined 58 candidate probiotic strains of *Lactobacillus* spp., isolated from various human loci and intended for the development and production of medicines and dietary supplements aimed at preventing diseases, including infectious etiology, of the gastrointestinal tract of people associated with post-COVID syndrome. The following characteristics of the strains were studied: antagonistic activity against test-cultures of pathogenic and opportunistic microorganisms; toxigenicity, toxicity, harmlessness, virulence, dermonecrotic properties of the test-subjects and an indicator of acid formation activity.

It was found that 63.5% of the strains had high antagonistic activity against all tested test-strains of microorganisms; 25% of lactobacilli had low antagonistic activity towards 1–2 test-strains, while they had high antagonistic activity towards the remaining test strains; 11.5% of lactobacilli had low antagonistic activity against 3 or more test strains.

39 out of 58 strains (70%) were toxigenic for laboratory animals, 2 strains (3%) were toxic. 17 tested strains were harmless, of which 5 strains turned out to be virulent when administered intraperitoneally. Thus, 12 strains of lactobacilli fully met the requirements for industrial probiotic strains. When studying the activity of acid formation, it was revealed, that in these strains this indicator was in the range from 60 ± 0.25 to 260 ± 1.42 °T.

Key words: *Lactobacillus* spp., antagonistic activities, toxigenicity, toxicity, virulence, safety, acid-forming activity, postcovid syndrome

For citation: Laishevtsev A.I., Vyushinsky P.A., Savinov V.A., Shastin P.N., Khabarova A.V., Yakimova E.A., Kapustin A.V., Supova A.V., Ezhova E.G., Belkova M.D., Kiseleva I.A., Zubkova E.S., Pasivkina M.A., Anurova M.N., Zhilenkova O.G., Aleshkin A.V. Preclinical study of the efficacy and safety of probiotic strains of *Lactobacillus* spp. with emphasis on combating and preventing gastrointestinal diseases during long-term COVID-19. Bacteriology. 2023; 8(3): 7–15. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-7-15

Термин «постковидный синдром» внесен в международную и российскую классификации заболеваний. Всемирная организация здравоохранения под этим диагнозом подразумевает комплекс симптомов, которые беспокоят пациентов после перенесенного COVID-19, длятся не менее 2 мес. и не могут быть объяснены альтернативным диагнозом. Общие симптомы включают усталость, одышку, когнитивную дисфункцию, нарушения обоняния и вкуса, расстройства пищеварения, а также другие и, как правило, оказывают влияние на повседневное функционирование. Симптомы могут появиться впервые после первоначального выздоровления после острого эпизода COVID-19 или сохраняться после первоначального заболевания. Симптомы также могут изменяться или рецидивировать с течением времени. Данные о длительных последствиях COVID-19 все еще ограничены, и многие пациенты продолжают испытывать симптомы на протяжении нескольких месяцев после выздоровления [1–3]. Некоторые исследования показывают, что до 30% пациентов продолжают испытывать симптомы более 6 мес. после начала заболевания [3–5].

Расстройства пищеварения при постковидном синдроме могут быть вызваны самим вирусом, как результат прямого цитопатического действия на эпителий слизистых оболочек, последующей мальабсорбции, индуцированной воспали-

тельной реакцией с инфильтрацией плазматическими клетками и лимфоцитами собственной пластинки кишечника, или быть связаны с лечением и госпитализацией [4–6]. В результате прогрессируют изменения микробиоты, формируются постинфекционная желудочно-кишечная дисфункция, гепатобилиарное поражение, расстройство вегетативной нервной регуляции, приводящие к возникновению таких симптомов, как диспепсия, диарея, тошнота, рвота, боли в эпигастральной области, снижение аппетита, которые могут продолжаться длительное время [7–10].

Одним из наиболее перспективных способов терапии и профилактики симптомов постковидного синдрома, связанных с желудочно-кишечным трактом (ЖКТ), является применение пробиотических микроорганизмов [11–13]. Ряд опубликованных систематических обзоров литературы, основанных на большом объеме данных, показали перспективность использования пробиотиков в качестве вспомогательных средств для профилактики дисбиотических нарушений у пациентов с COVID-19 [14–16]. Пробиотики сокращают продолжительность вирусных инфекций и снижают уязвимость к патогенам, усиливают иммунный ответ, поддерживают гомеостаз кишечника, снижают воспаление за счет стимуляции индукции противовоспалительных цитокинов и способны повысить эффективность вакцинации [13, 14].

Многообещающий эффект был продемонстрирован *Lactobacillus* spp. при дисбактериозе кишечника, вызванного COVID-19 [13, 14].

Несмотря на то, что штаммы *Lactobacillus* spp. являются одними из самых изученных и широко используемых в медицинских целях, существует необходимость в расширении пула этих бактерий для улучшения эффективности профилактики и расширения области их применения. Для этого проводятся исследования по подбору новых пробиотических штаммов, которые могут быть использованы в профилактических и терапевтических целях [17, 18]. В частности, было проведено открытое рандомизированное проспективное исследование 100 пациентов с COVID-19 старше 18 лет с целью определить клиническую эффективность и безопасность сорбированных пробиотиков *Bifidobacterium bifidum* 1 ($5 \cdot 10^8$ КОЕ) и *B. bifidum* 1 ($5 \cdot 10^7$ КОЕ) в сочетании с *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 ($5 \cdot 10^7$ КОЕ) в профилактике осложнений пневмонии, вызванной SARS-CoV-2. Продemonстрировано значимое положительное влияние этой терапии [19].

Из-за широкого спектра биологических свойств пробиотических штаммов отбор микроорганизмов происходит в несколько этапов: определение безвредности, вирулентности, токсигенности, токсичности и дермонекротических свойств, кислотообразования подобранных штаммов лактобацилл. При конструировании комплексных препаратов необходимо также выявить антагонистическую активность лактобацилл [20–22].

Учитывая отсутствие эффективных методов лечения постковидного синдрома, существует необходимость в поиске новых вариантов терапии и профилактики. Использование пробиотиков в качестве средства предупреждения постковидного синдрома основывается на понимании того, что микробиота кишечника играет важную роль в модуляции иммунного ответа и поддержании общего здоровья. Введение пробиотиков на основе лактобактерий с полезными для микробиоценоза кишечника свойствами поможет смягчить некоторые негативные последствия постковидного синдрома [11–14].

Целью данного исследования является подбор пробиотических штаммов *Lactobacillus* spp. для разработки лекарственного средства, направленного на профилактику ассоциированных с постковидным синдромом заболеваний, в т.ч. инфекционной этиологии, желудочно-кишечного тракта пациентов.

Материалы и методы

Пробиотические штаммы лактобацилл, выделенные из различных локусов здоровых людей (ЖКТ, вагинальное содержимое, верхние дыхательные пути и слюна), были взяты из музея коллекции нормальной микрофлоры ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора (табл. 1).

Доклинические исследования проводились с января по июнь 2022 г. на базе ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (решение биоэтического комитета №2572/22 от 30.11.2021). За 3 дня до начала эксперимента отбирали клинически здоровых животных. Разброс массы тела отобранных животных не превышал 20%, среднее значение массы тела не имело статисти-

чески достоверных различий между группами. При проведении клинического осмотра животных оценивали следующие показатели: положение тела животного, состояние глаз (слезотечение, выделение секрета), носа, характер стула, аппетит, характер дыхания, состояние шерстного покрова (пилоэрекция, выпадение шерсти, изменение цвета шерстного покрова). Особое внимание уделяли поведенческим реакциям животных как основному показателю, отражающему состояние нервной системы. Оценивали степень возбудимости животных по уровню двигательной активности и агрессивности, рефлекс «позы», «походки» и другие нарушения.

Для изучения токсигенности были использованы мыши линий C57BL/6 и CD-1 возрастом 2–3 нед. Для определения токсичности, безвредности и вирулентности использовались мыши тех же двух линий, возрастом 4–6 нед. Вес мышей во всех исследованиях находился в пределах 10–14 г. При определении дермонекротических свойств использовали кроликов породы советская шиншилла возрастом 6–8 нед., весом 1,0–1,5 кг и морских свинок возрастом 12–14 нед., весом 250–300 г [21, 22].

Исследование антагонистической активности штаммов проводили с помощью метода отсроченного антагонизма [20]. В ходе испытания производили посев исследуемых культур бляшками размером не более 10 мм, но не более трех бляшек на чашку с оптимальной питательной средой, далее проводили культивирование при 37°C в течение 24–48 ч. Лактобациллы выращивали как в аэробных, так и в анаэробных условиях. После этого проводилось ингибирование выращенных культур ультрафиолетовыми лучами в течение 30 мин. В 0,7%-й полужидкий мясопептонный агар при температуре 50°C вносили суспензии тест-культуры в объеме 1 мл, далее культуру размешивали и

Таблица 1. Исследуемые штаммы лактобацилл
Table 1. *Lactobacillus* strains studied

<i>L. casei</i> subsp. Shirota KHM-12	<i>L. animalis</i> 146
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> 101-1	<i>L. fermentum</i> K32-2
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> 101-2	<i>L. fermentum</i> K49-2
<i>L. plantarum</i> 242	<i>L. fermentum</i> K52-2
<i>L. plantarum</i> 421-2	<i>L. casei</i> 577
<i>L. acidophilus</i> NK-1	<i>L. plantarum</i> 152
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> 71 (A-23)	<i>L. plantarum</i> 270
<i>L. acidophilus</i> 4693	<i>L. paraplantarum</i> 290
<i>L. acidophilus</i> 66	<i>L. plantarum</i> 180
<i>L. acidophilus</i> K3Ш24	<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> 65
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 8-79	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
<i>L. fermentum</i> 2	ГКНМ216
<i>L. plantarum</i> 11 Зв	<i>L. helveticus</i> 110
<i>L. plantarum</i> 191 Г	<i>L. paracasei</i> 30 зв
<i>L. rhamnosus</i> 291 Г	<i>L. paracasei</i> 102
<i>L. acidophilus</i> 86	<i>L. paracasei</i> 33
<i>L. helveticus</i> ТШ	<i>L. plantarum</i> 219
<i>L. acidophilus</i> 100аш	<i>L. paracasei</i> 211
<i>L. acidophilus</i> 170	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> 230
<i>L. plantarum</i> C3 396	<i>L. alimentarius</i> 24
<i>L. plantarum</i> 7д	<i>L. plantarum</i> 70-3
<i>L. plantarum</i> 1863	<i>L. agilis</i> 1
<i>L. plantarum</i> 1787	<i>L. salivarius</i> 114
<i>L. casei</i> 526/1	<i>L. salivarius</i> K 13
<i>L. plantarum</i> 11д	<i>L. rhamnosus</i> B 22
<i>L. plantarum</i> 17	<i>L. johnsonii</i> B-13941
<i>L. buchneri</i> 98 3B	<i>L. casei</i> B-13206
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> 33	<i>L. plantarum</i> B-12781
<i>L. plantarum</i> 46	<i>L. rhamnosus</i> B-13944
	<i>L. reuteri</i> B-13940

наслаивали на исследуемые культуры лактобацилл. По истечении 15–20 мин чашки переворачивали и культивировали 18–24 ч при температуре 37°C. Учет результатов проводили, измеряя диаметр задержки роста тестовой культуры кронциркулем (в мм). За положительный результат (наличие антагонистической активности) принимается размер зоны задержки роста >20 мм.

Штаммы бактерий-антагонистов взяты в соответствии с МУ 2.3.2.2789-10: *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* 534, *Sh. sonnei* I фазы 941, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Kl. pneumoniae* K1 5054, *Proteus vulgaris* 401, *Proteus mirabilis* 56/10, *S. aureus* ATCC 12600, *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella Infantis* 2495, *Streptococcus pneumoniae* 1997, *Klebsiella pneumoniae* 13883, *Neisseria subflava* 1996, *Candida albicans* 140, *Clostridium difficile* 900, *Legionella pneumophila* 33152, *Helicobacter pylori* 545 [20].

Для определения токсигенности культур испытуемых штаммов их сеяли на жидкую питательную среду, выдерживали в термостате при 37°C, в течение 10 суток для накопления токсина, если такой продуцируется штаммом. Далее проводилось фильтрование через мембранный бактериальный фильтр из полиэфирсульфона (PES), диаметром пор 0,22 мкм (FILTER TECHNOLOGY GVS North America). Полученный фильтрат вводился неразведенным внутривентриально в объеме 1,0; 0,5; 0,1 мл. Контрольным животным вводили стерильный физиологический раствор в тех же объемах. За животными проводилось ежедневное наблюдение, в протоколе исследования отмечалось количество живых и павших животных. Срок наблюдения составлял 14 сут.

Токсичность испытуемых штаммов определяли следующим образом. Штаммы сеяли на жидкую питательную среду, выдерживали в термостате при 37°C, в течение 10 суток. Далее испытуемые суспензии прогревали при 100°C в течение 30 мин (в максимальной концентрации микробных клеток). Остывшую культуру вводили в нативном виде внутривентриально по 0,5 мл. За животными проводилось ежедневное наблюдение. В протоколе исследования отмечали количество живых и павших животных, наличие или отсутствие признаков нарушения здоровья и потери массы тела к концу срока наблюдения (14 суток) при введении максимально переносимой дозы.

Безвредность лактобацилл исследовали на взвеси штаммов 3-го пассажа в концентрации 10^8 , 10^9 , 10^{10} микробных клеток/мл. Бактериальную суспензию вводили перорально в объеме 0,5 мл. Срок наблюдения 5 суток. При отсутствии гибели животных, признаков нарушения здоровья и потери массы тела к концу срока наблюдения после введения суспензии штамма делали соответствующие выводы.

При определении вирулентности культуры лактобацилл второго пассажа, выращенные на плотных питательных средах, смывали 0,9%-м раствором натрия хлорида. Из полученной суспензии делали ряд десятикратных разведений. Полученную взвесь различной концентрации вводили перорально, внутривентриально, внутримышечно и подкожно по 0,5 мл. Далее в течение 14 суток за животными проводилось ежедневное наблюдение, отмечая в протоколе исследования количество живых и павших животных. По истечении срока наблюдения рассчитывали LD_{50} . Для более точного определения этого параметра расчет производился при по-

мощи пробит-анализа в программном приложении BioStat Pro 5.9.8 [21].

Дермонекротические свойства выбранных штаммов лактобацилл изучали путем их введения внутривенно в область спины экспериментальных животных (по 0,2 мл в двух концентрациях – $1 \cdot 10^{10}$ и $1 \cdot 10^9$ м.к.) После чего за животными проводилось ежедневное наблюдение, отмечая в протоколе исследования припухлость, красноту, наличие некроза, количество живых и павших животных. Срок наблюдения 5 суток. Для контроля чувствительности животных, каждому животному вводили взвесь штамма *Lactobacillus casei* B-13206, который обладает дермонекротической активностью. Взвесь испытуемого штамма вводили с правой стороны.

Активность кислотообразования штаммов лактобацилл является важным параметром их качества. Микроорганизмы, относящиеся к представителям молочнокислых бактерий, продуцируют разные кислоты, изменяющие pH окружающей среды (питательных сред *in vitro* или в кишечнике *in vivo*). Антагонизм молочнокислых бактерий в отношении микроорганизмов обусловлен образованием молочной кислоты, продукцией других антимикробных и антибиотикоподобных субстанций. Кислотность определяли в градусах Тернера (°Т) – вычисляли средний показатель из двух пробирок (2 параллельные пробы из каждой пробирки, при условии, что показатели их активности близки), по соответствующей формуле [21]. Изучаемую культуру смывали 0,9%-м раствором натрия хлорида и по 2,5 мл полученной взвеси вносили в 25 мл жидкой среды Блаурокка. Засев проводили в 2 пробирки. Содержимое тщательно перемешивали и инкубировали в течение 72 ч при температуре $38 \pm 1^\circ\text{C}$. После инкубации проводили определение кислотности в каждой пробирке (по 2 параллельные пробы). Каждую пробу в объеме 10 мл титровали раствором натрия гидроксида в концентрации 0,1 моль/л в присутствии индикатора фенолфталеина (2–3 капли) до появления стойкого слабо-розового окрашивания.

Результаты

На первом этапе исследования проводили оценку токсигенности штаммов *Lactobacillus* spp. Штаммы под номерами 1–5, 8–14, 16, 19–23, 25, 26, 28–31, 33, 34, 36, 37, 43–53 (табл. 1) проявляли токсигенные свойства, у подопытных животных были выявлены негативные последствия, приведшие к гибели отдельных особей в подгруппах. Наиболее часто у животных ухудшался внешний вид, шерстный покров становился взъерошенным, слизистые оболочки становились анемичными. Животные были менее подвижными, отказывались от корма и воды. Эти штаммы были исключены из дальнейших исследований ввиду своей токсигенности.

На следующем этапе было обнаружено, что штаммы 35 и 38 (табл. 1) также обладают токсичностью. У подопытных животных в этих группах выявлялись признаки ухудшения состояния, заключающиеся в изменении внешнего вида и поведения животных, отдельные особи погибли. Эти штаммы также были исключены из дальнейших исследований.

Все изучаемые нетоксигенные и нетоксичные штаммы оказались безвредными. На протяжении всего эксперимента у подопытных лабораторных животных не отмечались

Таблица 2. Антагонистическая активность испытуемых штаммов лактобацилл
Table 2. Antagonistic activity of the tested lactobacilli strains

№	Штаммы / Strains	Зоны подавления роста тест-культур, мм* / Growth inhibition zones of test cultures, mm*																	
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. subtilis</i> 534	<i>Sh. sonnei</i> I фазы 941	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>K. pneumoniae</i> K1 5054	<i>P. vulgaris</i> 401	<i>P. mirabilis</i> 56/10	<i>S. aureus</i> ATCC 12600	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. infantis</i> 2495	<i>S. pneumoniae</i> 1997	<i>K. pneumoniae</i> 13883	<i>N. subflava</i> 1996	<i>C. albicans</i> 140	<i>C. difficile</i> 900	<i>L. pneumophila</i> 33152	<i>H. pylori</i> 545
6	<i>L. acidophilus</i> NK-1	21	42	16	40	34	34	30	30	28	42	18	-	18	-	-	-	12	
15	<i>L. rhamnosus</i> 291 Г	30	33	25	28	20	40	45	30	20	33	15	20	17	20	16	-	17	14
18	<i>L. acidophilus</i> 100аш	30	30	20	35	50	42	26	27	-	20	-	-	20	-	-	-	18	22
27	<i>L. buchneri</i> 98-3В	24	38	20	30	50	>50	45	45	24	36	28	33	27	32	24	-	20	-
32	<i>L. fermentum</i> K-49-2	21	35	45	35	30	20	30	35	35	12	48	42	50	50	10	-	31	15
39	<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> 65	38	40	43	38	46	>50	43	40	23	28	25	18	17	24	35	-	17	-
40	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ГКМ216	-	-	45	>60	42	>60	13	30	18	16	30	25	16	25	30	-	18	13
41	<i>L. helveticus</i> 110	11	15	22	30	40	19	-	18	24	15	44	45	32	24	25	-	19	22
42	<i>L. paracasei</i> 30зв	-	-	-	-	>50	>50	-	-	25	32	27	40	36	45	28	-	-	18
54	<i>L. johnsonii</i> B-13941	23	27	48	43	55	42	45	33	30	27	32	24	22	26	14	-	14	22
56	<i>L. plantarum</i> B-12781	-	31	43	44	24	25	42	38	32	31	41	30	35	30	34	-	22	15
58	<i>L. reuteri</i> B-13940	28	30	44	24	50	26	30	35	26	30	40	30	25	24	15	-	-	21

*За положительный результат (наличие антагонистической активности) принимается размер зоны задержки роста >20 мм.
*The size of the growth retardation zone is taken to be more than 20 mm as a positive result (presence of antagonistic activity).

признаки нарушения здоровья и потери массы тела, отсутствовали павшие животные к концу срока исследования.

В процессе изучения вирулентности штаммов *Lactobacillus* spp., обнаружено, что при пероральном, внутримышечном и подкожном введении все отобранные штаммы не обладают вирулентностью, это подтверждается отсутствием клинических признаков заболеваний, ухудшения состояния здоровья, гибели животных в период 14 суток наблюдения. Однако штаммы 55, 57, 7, 17, 24 (табл. 1) оказались вирулентными для лабораторных животных. При этом у животных фиксировалось развитие клинических признаков типичных для инфекционного процесса. Ld_{50} для штамма *Lactobacillus casei* B-13206 составил $4,2 \cdot 10^8$ м.к., для *Lactobacillus rhamnosus* B-13944 – $2,5 \cdot 10^8$ м.к., для *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* 71 (A-23) – $1,1 \cdot 10^9$ м.к., для *Lactobacillus helveticus* ТШ – $6,3 \cdot 10^9$ м.к., для *Lactobacillus casei* 526/1 – $2,0 \cdot 10^9$ м.к.

Еще одной важной характеристикой пробиотических производственных штаммов является отсутствие дермонекротических свойств. При введении взвеси штамма *Lactobacillus casei* B-13206, который обладает дермонекротической активностью, у всех животных возникали признаки некроза (припухлость, краснота, отек). При введении штаммов, прошедших предыдущие испытания, не наблюдались дермонекротические признаки, ухудшение состояния здоровья, гибель животных в период 5 суток наблюдения (рисунок).

Одной из важнейших характеристик пробиотических организмов является антагонистическая активность против патогенных бактерий, в т.ч. антибиотикорезистентных, к которым относятся выбранные тест-штаммы. Результаты изу-

чения данного показателя для 12 штаммов *Lactobacillus* spp., отобранных после всех экспериментов, представлены в табл. 2. Лактобациллы проявляют выраженную антагонистическую активность в отношении многих патогенных микроорганизмов благодаря способности к продукции органических кислот (молочной, уксусной, пропионовой), перекисей и бактериоцинов. Определяли активность кислотообразования штаммов *Lactobacillus* spp., результаты определения активности кислотообразования испытуемых штаммов представлены в табл. 3.

Таблица 3. Активность кислотообразования испытуемых штаммов (95%-й доверительный интервал)
Table 3. Acid formation activity of the tested strains (95% confidence interval)

№	Штамм / Strain	Кислотообразование, °Т / Acid formation, °T
6	<i>L. acidophilus</i> NK-1	260 ± 1,11
15	<i>L. rhamnosus</i> 291 Г	120 ± 1,2
18	<i>L. acidophilus</i> 100аш	130 ± 0,7
27	<i>L. buchneri</i> 98 3В	170 ± 0,5
32	<i>L. fermentum</i> K49-2	60 ± 0,25
39	<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> 65	260 ± 1,42
40	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 216	240 ± 1,8
41	<i>L. helveticus</i> 110	420 ± 2,1
42	<i>L. paracasei</i> 30 зв	120 ± 3,5
54	<i>L. johnsonii</i> B-13941	240 ± 2,9
56	<i>L. plantarum</i> B-12781	120 ± 0,7
58	<i>L. reuteri</i> B-13940	80 ± 2,7

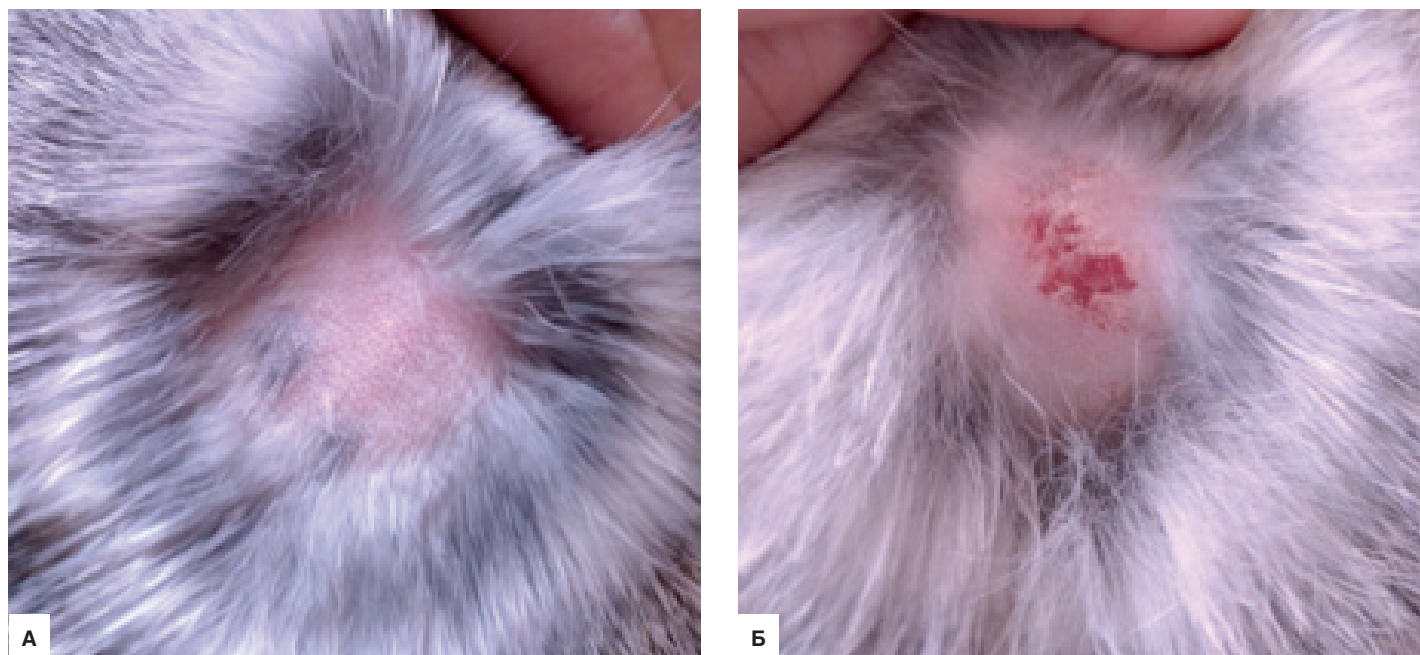


Рисунок. Определение дермoneкротических свойств *Lactobacillus* spp. А. Кожные покровы после введения изучаемых штаммов *Lactobacillus* spp. Б. Кожные покровы после введения штамма *L. casei* B-13206.
Figure. Determination of dermonecrotic properties of *Lactobacillus* spp. А. Skin after administration of the studied strains of *Lactobacillus* spp. В. Skin after injection of *L. casei* strain B-13206.

Наибольшая активность кислотообразования отмечается у штамма *L. helveticus* 110, в 1,6 раза превосходит по этому показателю *L. casei* subsp. *casei* 65, *L. acidophilus* NK-1, в 1,7 раза – *L. johnsonii* B-13941, в 1,75 раз – *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 216, в 2,5 раза – *L. buchneri* 98 3В, в 3,2 раза – *L. acidophilus* 100аш, в 3,5 раза – *L. rhamnosus* 291 Г, *L. plantarum* B-12781, в 5,25 раз – *L. reuteri* B-13940, в 7 раз – *L. fermentum* K49-2.

Обсуждение

В данной работе были поставлены и решены следующие задачи: определение штаммов-антагонистов (при конструировании комплексных препаратов); определение безвредности, вирулентности, токсигенности, токсичности и дермoneкротических свойств, кислотообразования подобранных штаммов лактобацилл. Отобрано 12 штаммов *Lactobacillus* spp., отвечающих требованиям, предъявляемым к производственным штаммам продуцентам.

Определение штаммов-антагонистов позволяет выбирать те, которые смогут конкурировать с патогенными микроорганизмами в кишечнике и вытеснять их, тем самым улучшая состояние микробиоты и общего здоровья. В исследовании проверяли антагонизм лактобацилл к *Staphylococcus aureus* ATCC (2 штамма), *Escherichia coli* ATCC (2 штамма), *Bacillus subtilis*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella Infantis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria subflava*, *Candida albicans*, *Clostridium difficile*, *Legionella pneumophila*, *Helicobacter pylori*. Данные бактерии и грибы поражают различные системы макроорганизма: ЖКТ, мочеполовую систему, легкие, вызывают раневые инфекции. Критическую значимость в выборе данных штаммов сыграла их устойчивость к современным антибиотическим препаратам [23].

Определение безвредности штаммов лактобацилл при оральном применении необходимо для того, чтобы исключить возможность негативного влияния на здоровье человека при их использовании. Определение вирулентности и токсигенности помогает выбрать штаммы, которые не будут вызывать заболеваний или интоксикаций. Определение дермoneкротических свойств необходимо для того, чтобы исключить возможность развития некрозов в месте введения препарата. Определение кислотообразования подобранных штаммов лактобацилл позволяет выбрать те, которые смогут эффективно колонизировать кишечник и создавать неблагоприятную среду для патогенных микроорганизмов. Все эти этапы помогают создать комплексный препарат, который будет максимально эффективным и безопасным при использовании в лечении и профилактике различных заболеваний.

Данное исследование представляет собой важный шаг на пути к разработке лекарственного средства на основе пробиотических штаммов *Lactobacillus* spp., направленного на профилактику ассоциированных с постковидным синдромом заболеваний, в т.ч. инфекционной этиологии, ЖКТ людей. В исследовании выявлено 12 штаммов лактобацилл, которые проявляют пробиотические свойства и при этом являются безопасными.

Заключение

В исследовании было проанализировано 58 штаммов лактобацилл. Из них 39 продуцировали экзотоксины, пагубно влияющие на подопытных лабораторных животных, 2 штамма оказались токсичными, 17 – безвредными. При испытаниях по определению вирулентности 5 из 17 штаммов вызвали признаки инфекционного процесса. Таким образом, было отобрано 12 штаммов лактобактерий, удовлетво-

ряющих требованиям по токсигенности, токсичности, безвредности. Они являются невирулентными, у них отсутствуют дерматонекротические свойства.

Несмотря на эти перспективные результаты, необходимы дальнейшие клинические исследования для оценки эффективности и безопасности линейки лекарственных средств на основе пробиотических штаммов *Lactobacillus* spp., выделенных от современных здоровых людей, в профилактике заболеваний, в т.ч. тех, которые ассоциируются с постковидным синдромом, и при решении задач санации различных биотопов.

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

Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

Financial support

The authors declare no funding.

Литература

- Available at: www.who.int (data access 25 April 2023).
- Available at: 77.rospotrebnadzor.ru (data access 25 April 2023).
- Choudhury A, Tariq R, Jena A, Vesely EK, Singh S, Khanna S, et al. Gastrointestinal manifestations of long COVID: A systematic review and meta-analysis. *Therap Adv Gastroenterol.* 2022 Aug 19;15:17562848221118403. DOI: 10.1177/17562848221118403
- Cheung KS, Hung IFN, Chan PPY, Lung KC, Tso E, Liu R, et al. Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology.* 2020 Jul;159(1):81-95. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.03.065
- Marasco G, Cremon C, Barbaro MR, Salvi D, Cacciari G, Kagramanova A, et al.; and the GI-COVID19 Study Group. Prevalence of Gastrointestinal Symptoms in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection: Results of the Prospective Controlled Multinational GI-COVID-19 Study. *Am J Gastroenterol.* 2022 Jan 1;117(1):147-157. DOI: 10.14309/ajg.0000000000001541
- Zhang H, Li HB, Lyu JR, Lei XM, Li W, Wu G, et al. Specific ACE2 expression in small intestinal enterocytes may cause gastrointestinal symptoms and injury after 2019-nCoV infection. *Int J Infect Dis.* 2020; 96:19-24. DOI:10.1016/j.ijid.2020.04.027
- Yeoh YK, Zuo T, Lui GC, Zhang F, Liu Q, Li AY, et al. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut.* 2021 Apr;70(4):698-706. DOI: 10.1136/gutjnl-2020-323020
- Elshazli RM, Kline A, Elgaml A, Aboutaleb MH, Salim MM, Omar M, et al. Gastroenterology manifestations and COVID-19 outcomes: A meta-analysis of 25,252 cohorts among the first and second waves. *J Med Virol.* 2021 May;93(5):2740-2768. DOI: 10.1002/jmv.26836
- Meringer H, Mehandru S. Gastrointestinal post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2022 Jun;19(6):345-346. DOI: 10.1038/s41575-022-00611-z
- Settanni CR, Ianiro G, Ponziani FR, Bibbò S, Segal JP, Cammarota G, et al. COVID-19 as a trigger of irritable bowel syndrome: A review of potential mechanisms. *World J Gastroenterol.* 2021 Nov 21;27(43):7433-7445. DOI: 10.3748/wjg.v27.i43.7433
- Goodman C, Keating G, Georgousopoulou E, Hesse C, Levett K. Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhoea: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2021 Aug 12;11(8):e043054. DOI: 10.1136/bmjopen-2020-043054
- Wang B, Zhang L, Wang Y, Dai T, Qin Z, Zhou F, et al. Alterations in microbiota of patients with COVID-19: potential mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Apr 29;7(1):143. DOI: 10.1038/s41392-022-00986-0
- Sundararaman A, Ray M, Ravindra PV, Halami PM. Role of probiotics to combat viral infections with emphasis on COVID-19. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020 Oct;104(19):8089-8104. DOI: 10.1007/s00253-020-10832-4
- Xavier-Santos D, Padilha M, Fabiano GA, Vinderola G, Gomes Cruz A, Sivieri K, et al. Evidences and perspectives of the use of probiotics, prebiotics, synbiotics, and postbiotics as adjuvants for prevention and treatment of COVID-19: A bibliometric analysis and systematic review. *Trends Food Sci Technol.* 2022 Feb;120:174-192. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.12.033
- Hu J, Zhang L, Lin W, Tang W, Chan FKL, Ng SC. Review article: Probiotics, prebiotics and dietary approaches during COVID-19 pandemic. *Trends Food Sci Technol.* 2021 Feb;108:187-196. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.12.009
- Chakraborty M, Munshi SK. The prospects of employing probiotics in combating COVID-19. *Tzu Chi Med J.* 2021 Oct 5;34(2):148-159. DOI: 10.4103/tcmj.tcmj_104_21
- De Boeck I, Cauwenberghs E, Spacova I, Gehrman T, Eilers T, Delanghe L, et al. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of a Throat Spray with Selected Lactobacilli in COVID-19 Outpatients. *Microbiol Spectr.* 2022 Oct 26;10(5):e0168222. DOI: 10.1128/spectrum.01682-22
- Shang X, E FF, Guo KL, Li YF, Zhao HL, Wang Y, et al. Effectiveness and Safety of Probiotics for Patients with Constipation-Predominant Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis of 10 Randomized Controlled Trials. *Nutrients.* 2022 Jun 15;14(12):2482. DOI: 10.3390/nu14122482
- Мескина ЕР, Хадисова МК, Сташко ТВ, Галкина ЛА, Целипанова ЕЕ, Шилкина ИМ. Эффективность применения сорбированных пробиотиков в комплексной терапии пневмонии, вызванной SARS-CoV-2: качество жизни, связанное со здоровьем, в краткосрочном исходе COVID-19. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2022;11(3):69-80. DOI: 10.33029/2305-3496-2022-11-3-69-80
- МУ 2.3.2.2789-10. Методические указания, по санитарно-эпидемиологической оценке, безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов», Москва.
- МУК 4.2.602-10 «Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков». М., 2010.
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (под ред. Миронова АН). Ч. 1, Ч. 2. Изд. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.
- Kariyawasam RM, Julien DA, Jelinski DC, Larose SL, Rennert-May E, Conly JM, et al. Antimicrobial resistance (AMR) in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis (November 2019-June 2021). *Antimicrob Resist Infect Control.* 2022 Mar 7;11(1):45. DOI: 10.1186/s13756-022-01085-z

References

- Available at: www.who.int (data access 25 April 2023).
- Available at: 77.rospotrebnadzor.ru (data access 25 April 2023).
- Choudhury A, Tariq R, Jena A, Vesely EK, Singh S, Khanna S, et al. Gastrointestinal manifestations of long COVID: A systematic review and meta-analysis. *Therap Adv Gastroenterol.* 2022 Aug 19;15:17562848221118403. DOI: 10.1177/17562848221118403

4. Cheung KS, Hung IFN, Chan PPY, Lung KC, Tso E, Liu R, et al. Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology*. 2020 Jul;159(1):81-95. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.03.065
5. Marasco G, Cremon C, Barbaro MR, Salvi D, Cacciari G, Kagramanova A, et al.; and the GI-COVID19 Study Group. Prevalence of Gastrointestinal Symptoms in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection: Results of the Prospective Controlled Multinational GI-COVID-19 Study. *Am J Gastroenterol*. 2022 Jan 1;117(1):147-157. DOI: 10.14309/ajg.0000000000001541
6. Zhang H, Li HB, Lyu JR, Lei XM, Li W, Wu G, et al. Specific ACE2 expression in small intestinal enterocytes may cause gastrointestinal symptoms and injury after 2019-nCoV infection. *Int J Infect Dis*. 2020; 96:19-24. DOI:10.1016/j.ijid.2020.04.027
7. Yeoh YK, Zuo T, Lui GC, Zhang F, Liu Q, Li AY, et al. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut*. 2021 Apr;70(4):698-706. DOI: 10.1136/gutjnl-2020-323020
8. Elshazli RM, Klaine A, Elgaml A, Aboutaleb MH, Salim MM, Omar M, et al. Gastroenterology manifestations and COVID-19 outcomes: A meta-analysis of 25,252 cohorts among the first and second waves. *J Med Virol*. 2021 May;93(5):2740-2768. DOI: 10.1002/jmv.26836
9. Meringer H, Mehandru S. Gastrointestinal post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2022 Jun;19(6):345-346. DOI: 10.1038/s41575-022-00611-z
10. Settanni CR, Ianiro G, Ponziani FR, Bibbò S, Segal JP, Cammarota G, et al. COVID-19 as a trigger of irritable bowel syndrome: A review of potential mechanisms. *World J Gastroenterol*. 2021 Nov 21;27(43):7433-7445. DOI: 10.3748/wjg.v27.i43.7433
11. Goodman C, Keating G, Georgousopoulou E, Hespe C, Levett K. Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhoea: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2021 Aug 12;11(8):e043054. DOI: 10.1136/bmjopen-2020-043054
12. Wang B, Zhang L, Wang Y, Dai T, Qin Z, Zhou F, et al. Alterations in microbiota of patients with COVID-19: potential mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther*. 2022 Apr 29;7(1):143. DOI: 10.1038/s41392-022-00986-0
13. Sundararaman A, Ray M, Ravindra PV, Halami PM. Role of probiotics to combat viral infections with emphasis on COVID-19. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020 Oct;104(19):8089-8104. DOI: 10.1007/s00253-020-10832-4
14. Xavier-Santos D, Padilha M, Fabiano GA, Vinderola G, Gomes Cruz A, Sivieri K, et al. Evidences and perspectives of the use of probiotics, prebiotics, synbiotics, and postbiotics as adjuvants for prevention and treatment of COVID-19: A bibliometric analysis and systematic review. *Trends Food Sci Technol*. 2022 Feb;120:174-192. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.12.033
15. Hu J, Zhang L, Lin W, Tang W, Chan FKL, Ng SC. Review article: Probiotics, prebiotics and dietary approaches during COVID-19 pandemic. *Trends Food Sci Technol*. 2021 Feb;108:187-196. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.12.009
16. Chakraborty M, Munshi SK. The prospects of employing probiotics in combating COVID-19. *Tzu Chi Med J*. 2021 Oct 5;34(2):148-159. DOI: 10.4103/tcmj.tcmj_104_21
17. De Boeck I, Cauwenberghs E, Spacova I, Gehrman T, Eilers T, Delanghe L, et al. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of a Throat Spray with Selected Lactobacilli in COVID-19 Outpatients. *Microbiol Spectr*. 2022 Oct 26;10(5):e0168222. DOI: 10.1128/spectrum.01682-22
18. Shang X, E FF, Guo KL, Li YF, Zhao HL, Wang Y, et al. Effectiveness and Safety of Probiotics for Patients with Constipation-Predominant Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis of 10 Randomized Controlled Trials. *Nutrients*. 2022 Jun 15;14(12):2482. DOI: 10.3390/nu14122482
19. Meskina ER, Khadisova MK, Stashko TV, Galkina LA, Tselipanova EE, Shilkina IM. Efficiency of application of sorbed probiotics in the complex therapy of pneumonia caused by SARS-CoV-2. Quality of life in the short term COVID-19. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2022;11(3):69-80. DOI: 10.33029/2305-3496-2022-11-3-69-80 (In Russian).
20. MU 2.3.2.2789-10. Metodicheskie ukazaniya, po sanitarno-epidemiologicheskoi otsenke, bezopasnosti i funktsional'nogo potentsiala probioticheskikh mikroorganizmov, ispol'zuemykh dlya proizvodstva pishchevykh produktov», Moscow. (In Russian).
21. MUK 4.2.602-10 «Sistema predregistratsionnogo doklinicheskogo izucheniya bezopasnosti preparatov. Otbor, proverka i khraneniye proizvodstvennykh shtammov, ispol'zuemykh pri proizvodstve probiotikov». Moscow, 2010. (In Russian).
22. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv (pod red. Mironova AN). Ch. 1, Ch. 2. Izd. FGBU «NTsESMP» Minzdrava Rossii. (In Russian).
23. Kariyawasam RM, Julien DA, Jelinski DC, Larose SL, Rennert-May E, Conly JM, et al. Antimicrobial resistance (AMR) in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis (November 2019-June 2021). *Antimicrob Resist Infect Control*. 2022 Mar 7;11(1):45. DOI: 10.1186/s13756-022-01085-z

Информация о соавторах:

Вьюшинский Павел Александрович, заместитель генерального директора ООО «Зеленые линии» по связям с научными организациями

Савинов Василий Александрович, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории микологии и антибиотиков им. А.Х.Саркисова ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.П.Коваленко РАН»

Шастин Павел Николаевич, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник лаборатории диагностики и контроля антибиотикорезистентности возбудителей наиболее клинически значимых инфекционных болезней животных ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.П.Коваленко РАН»

Хабарова Алла Викторовна, младший научный сотрудник лаборатории диагностики и контроля антибиотикорезистентности возбудителей наиболее клинически значимых инфекционных болезней животных ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.П.Коваленко РАН»

Якимова Эльвира Алексеевна, научный сотрудник лаборатории болезней пчел ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.П.Коваленко РАН»

Капустин Андрей Владимирович, доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.П.Коваленко РАН»

Супова Анастасия Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории диагностики и контроля антибиотикорезистентности возбудителей наиболее клинически значимых инфекционных болезней животных ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.П.Коваленко РАН»

Ежова Екатерина Геннадьевна, младший научный сотрудник лаборатории диагностики и контроля антибиотикорезистентности возбудителей наиболее клинически значимых инфекционных болезней животных ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.П.Коваленко РАН»

Белкова Мария Дмитриевна, руководитель отдела «Биотехнологический центр», ООО «Зеленые линии»

Киселёва Ирина Анатольевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора

Зубкова Екатерина Сергеевна, научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора

Анурова Мария Николаевна, младший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора; ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова (Сеченовский Университет), Институт фармации

Пасивкина Мария Антоновна, младший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора

Жиленкова Ольга Геннадьевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологии бифидобактерий ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора

Алешкин Андрей Владимирович, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, заместитель директора по медицинской биотехнологии ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Pavel A. Vyushinsky, Deputy General Director of LLC «Green Lines» for relations with scientific organizations

Vasily A. Savinov, PhD in Biological Sciences, Researcher, A.Kh.Sarkisov Laboratory of Mycology and Antibiotics, K.I.Skryabin and Ya.R.Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Sciences RAS

Pavel N. Shastin, PhD in Veterinary Sciences, Senior Researcher, Laboratory for Diagnosis and Control of Antibiotic Resistance of Causative Agents of the Most Clinically Significant Infectious Animal Diseases, K.I.Skryabin and Ya.R.Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Sciences RAS

Alla V. Khabarova, Junior Researcher, Laboratory for Diagnosis and Control of Antibiotic Resistance of Causative Agents of the Most Clinically Significant Infectious Animal Diseases, K.I.Skryabin and Ya.R.Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Sciences RAS

Elvira A. Yakimova, researcher of the laboratory of bee diseases, K.I.Skryabin and Ya.R.Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Sciences RAS

Andrey V. Kapustin, PhD, DSc (Biological Sciences), Deputy Director for Research, K.I.Skryabin and Ya.R.Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Sciences RAS

Anastasia V. Supova, Junior Researcher, Laboratory for Diagnosis and Control of Antibiotic Resistance of Causative Agents of the Most Clinically Significant Infectious Animal Diseases, K.I.Skryabin and Ya.R.Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Sciences RAS

Ekaterina G. Ezhova, Junior Researcher, Laboratory for Diagnosis and Control of Antibiotic Resistance of Causative Agents of the Most Clinically Significant Infectious Animal Diseases, K.I.Skryabin and Ya.R.Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Sciences RAS

Maria D. Belkova, Head of the Biotechnology Center Department, Green Lines LLC

Irina A. Kiseleva, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology of Bacteriophages, G.N.Gabrichesky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rosпотребнадзор

Ekaterina S. Zubkova, Researcher, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology of Bacteriophages, G.N.Gabrichesky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rosпотребнадзор

Maria N. Anurova, Junior Researcher, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology of Bacteriophages, G.N.Gabrichesky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rosпотребнадзор; Sechenov University, Institute of Pharmacy

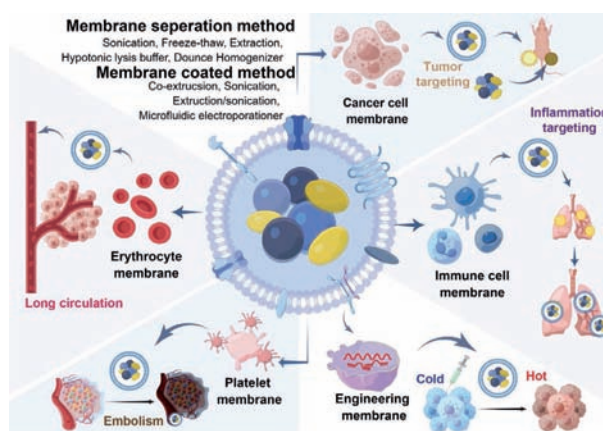
Maria A. Pasivkina, Junior Researcher, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology of Bacteriophages, G.N.Gabrichesky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rosпотребнадзор

Olga G. Zhilenkova, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Laboratory of Bifidobacteria Biology, G.N.Gabrichesky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rosпотребнадзор

Andrey V. Aleshkin, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, PhD, DSc (Biological Sciences), Deputy Director for Medical Biotechnology, G.N.Gabrichesky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rosпотребнадзор

Наночастицы, покрытые клеточной мембраной, в биомедицине

Инкапсуляция в клеточную мембрану является растущей концепцией в наномедицине, поскольку она достигает цели маскировки наночастиц, реализуя удобство доставки лекарств, биовизуализации и детоксикации. Клеточные мембраны состоят из двухслойных липидно-фосфолипидных слоев, которые обладают уникальными свойствами в отношении механизма клеточного поглощения, способности нацеливания, иммуномодуляции и регенерации. Текущие медицинские применения клеточных мембран включают рак, воспаление, регенерацию и так далее. В публикации проводится общий библиометрический обзор наночастиц, покрытых клеточной мембраной, охватывающий 11 лет эволюции, чтобы предоставить исследователям в этой области всестороннее представление о соответствующих достижениях и тенденциях. Авторы анализируют данные из базы данных Web of Science Core Collection и извлекают ежегодные публикации и цитаты, наиболее продуктивные страны/регионы, наиболее влиятельных ученых, сотрудничество журналов и учреждений. Авторы также разделили клеточные мембраны на несколько подгрупп, чтобы лучше понять применение различных клеточных мембран в медицинских сценариях. Это исследование обобщает текущие исследования в области наночастиц, покрытых клеточной мембраной, и интуитивно указывает направление для будущих исследований.



Zhang Y, et al.

A Machine-Learning-Based Bibliometric Analysis of Cell Membrane-Coated Nanoparticles in Biomedical Applications over the Past Eleven Years. Global Challenges. 2023 Feb;2200206. DOI: 10.1002/gch2.202200206

Разработка способа капсулирования симбиотических бактерий

В.Д.Похиленко, И.А.Дунайцев, Т.А.Калмантаев, В.П.Левчук, А.Н.Сомов, И.А.Чукина

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

Теоретически и экспериментально обоснованы подходы по выбору метода капсулирования живых симбиотических бактерий – продуцентов антимикробных субстанций и обладающих свойствами пробиотиков. Разработаны метод капсулирования бактерий в Са-альгинатные гранулы разного размера и способ раскрытия капсул для количественной оценки жизнеспособности и антагонистической активности бактерий. Определены условия лиофилизации гранул, обеспечивающей сохранение рекомендованного количества жизнеспособных бактерий, и исследована сохраняемость микроорганизмов в составе суспензии гранул и лиофилизированных гранул в течение года. Показана возможность использования Са-альгинатных гранул с пробиотиками в виде суспензии по типу швейцарского пробиотика BioGaia® со сроком хранения всего 2,5 мес. Это открывает возможности для создания жидкой функционально активной формы капсулированного пробиотика, дешевле известных прототипов.

Область применения результатов – препаратостроение: новые формы капсулированных про- и метабиотиков с улучшенными возможностями по функциональному составу и дозировке, спектру активности против кишечных патогенов, целевой доставке, пролонгированной жизнеспособности и персональному использованию.

Область применения продукта – медицина, ветеринария и пищевая индустрия.

Ключевые слова: капсулирование, альгинат, гранулы, пробиотики, свойства

Для цитирования: Похиленко В.Д., Дунайцев И.А., Калмантаев Т.А., Левчук В.П., Сомов А.Н., Чукина И.А. Разработка способа капсулирования симбиотических бактерий. Бактериология. 2023; 8(3): 16–25. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-16-25

Development of a method for symbiotic bacteria encapsulation

V.D.Pokhilenko, I.A.Dunaytsev, T.A.Kalmantaev, V.P.Levchuk, A.N.Somov, I.A.Chukina

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

The approaches were substantiated both theoretically and experimentally for the choice of the method of encapsulation of live symbiotic bacteria having the properties of probiotics and capable of producing of antimicrobial substances. A technique has been developed for encapsulation of probiotic bacteria in Ca-alginate granules of different sizes and a technique for the capsules opening developed in order to quantify their viability and antagonistic activity. The conditions of dehydration of the obtained granules were determined using lyophilization, which ensures the preservation of recommended amounts of viable bacteria. The persistence of microorganisms in the suspension of granules and freeze-dried granules was studied for the period of one year. The possibility of using Ca-alginate granules with probiotics in the form of a suspension similar to the Swiss probiotic BioGaia® with a shelf life of only 2.5 months was shown. This opens up opportunities for creating a liquid functionally active form of encapsulated probiotic, cheaper than known prototypes. The scope of the results is drug engineering: new forms of encapsulated pro- and metabiotics with improved capabilities in terms of functional composition and dosage, spectrum of activity against intestinal pathogens, targeted delivery, prolonged viability and personal use.

Key words: encapsulation, alginate, granules, probiotics, properties

For citation: Pokhilenko V.D., Dunaytsev I.A., Kalmantaev T.A., Levchuk V.P., Somov A.N., Chukina I.A. Development of a method for symbiotic bacteria encapsulation. Bacteriology. 2023; 8(3): 16–25. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-16-25

Для корреспонденции:

Похиленко Виктор Данилович, доктор технических наук, ведущий научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, р.п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская область, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0027

Статья поступила 15.02.2023, принята к печати 29.09.2023

For correspondence:

Viktor D. Pokhilenko, PhD, DSc (Technical Sciences), Leading Researcher of Department of Biological Technology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0027

The article was received 15.02.2023, accepted for publication 29.09.2023

Разработка новых лекарственных средств и методов борьбы с вредными микроорганизмами является парадигмой, связанной с улучшением среды обитания человека и животных. Антибиотики, как важнейшие лекарственные препараты в борьбе с возбудителями инфекционных заболеваний, действуют без разбора как на патогенные, так и на полезные микроорганизмы. В результате бесконтрольного применения антибиотиков патогенные бактерии выработали эффективные механизмы устойчивости к ним, что превратилось в общемировую проблему [1]. Нарушение микробиома, в т.ч. вызванное приемом антибиотиков, плохими экологическими условиями, приводит к развитию разнообразных патологических состояний организма человека: аллергических и аутоиммунных заболеваний, инсультов, сахарного диабета, ожирения, онкологии, остеопороза, катаракт, болезни Альцгеймера, паркинсонизма и пр. [2, 3]. На восстановление и поддержание микробиома направлена пробиотическая терапия с более чем 70-летней историей, не утратившая свою актуальность и по сей день. Однако для усиления функциональной эффективности препаратов пробиотиков в условиях возросшего экологического прессинга необходимо дальнейшее их совершенствование с учетом современной обстановки.

Поэтому актуальными являются исследования, направленные на получение новых рецептурных форм, позволяющих доставлять функционально активные пробиотические бактерии в нижние отделы кишечного тракта для восстановления и поддержания индигенной микрофлоры. Распространенным способом защиты живых клеток пробиотических бактерий от разрушения пищеварительными системами желудка, 12-перстной и тонкой кишки является покрытие таблетированных форм препаратов полимерными оболочками, а также помещение порошковых форм в устойчивые к биологическим средам капсулы. Для этого концентрат клеточной массы бактерий вначале обезвоживают с помощью метода замораживания-высушивания (*freeze-drying*), затем измельчают до порошковидного состояния, смешивают с наполнителями, гранулируют, фасуют в желатиновые капсулы или же прессуют в таблетки. Однако лишь некоторые виды пробиотических бактерий способны пережить все эти манипуляции без потери значительного числа живых клеток, составляющих основу действующего начала сухих твердых и порошковых форм препаратов. Распылительное высушивание (*spray drying*), несмотря на возможность получения с его помощью однородных по структуре и легко диспергируемых в воде порошков, пробиотические бактерии переносят еще хуже [4, 5], поэтому этот метод в основном применяется для изготовления пробиотиков на основе лишь наиболее термоустойчивых видов, например *Enterococcus* и *Bacillus*.

В то же время существуют и другие интересные решения по конструированию и целевой доставке пробиотических микроорганизмов. Это, прежде всего, капсулирование (инкапсуляция/иммобилизация) живых клеток с использованием биосовместимых и биodeградируемых полимеров природного происхождения [6–8]. Инкапсуляция – процесс формирования непрерывного покрытия вокруг внутренней матрицы – ядра гранулы с микроорганизмами. В этой структуре предполагается двунаправленная диффузия молекул: приток кислорода, питательных веществ и факторов роста, а также отток продуктов метаболизма.

Вкратце, иммобилизация направлена на защиту живых клеток от экстремальных физико-химических воздействий, таких как экстремальные pH, температура, соли желчи [9–12]; достижение высоких удельных концентраций микробов [13]; снижение микробной контаминации посторонней микрофлорой, а также на более быстрые темпы роста и биосинтеза штаммами полезных метаболитов [14].

Для капсулирования различных видов лечебных средств часто используются липосомы, которые способны полно и безопасно контактировать с тканями и клетками организма, доставляя им лекарственную субстанцию. Однако заключать в липосомы сходные по размерам микробные клетки не имеет смысла. Для микробов более приемлемы подходы по иммобилизации в полимерные матрицы, например на основе натриевой соли альгиновой кислоты, с последующей сшивкой в моносферы при помощи ионов Ca^{++} и получением на выходе т.н. Са-альгинатных гранул [6, 14, 15]. Альгинаты представляют собой природные полисахариды – линейные сополимеры 1,4-связанных остатков β -D-маннуроносовой (M) и α -L-гулууроносовой (G) кислоты.

Если при получении классических пробиотиков, согласно давно устоявшимся критериям, должны быть использованы только строго отобранные микроорганизмы (табл. 1), то при изготовлении ферментированной продукции такой строгости нет. Однако, чтобы ферментированные молочные продукты обладали достаточным пробиотическим потенциалом, в пищевой промышленности установлен уровень концентрации пробиотических бактерий на момент потребления: не ниже 10^6 КОЕ/г [6]. В качестве пробиотиков в них чаще всего используются различные виды и штаммы лактобацилл, бифидобактерий, а также другие микроорганизмы, включая некоторые расы дрожжей, штаммы *Enterococcus*, *Streptococcus* и *Propionibacterium* [6, 16].

Табл. 1. Критерии для определения и выбора пробиотических бактерий
Table 1. Criteria for the determination and selection of probiotic bacteria

Критерий / <i>Criteria</i>	Требования / <i>Requirements</i>
Безопасность / <i>Safety</i>	Бактерии выделены от человека, не патогенны, безопасны (GRAS) / <i>Bacteria isolated from humans, not pathogenic, safe</i>
Функциональность / <i>Functionality</i>	Устойчивость к разрушению соляной кислотой желудка и солями желчи тонкого кишечника. Прилипаемость к эпителиальной ткани кишечника. Способность колонизировать желудочно-кишечный тракт. Модуляция иммунных реакций. Производители антимикробных веществ. Влияние на метаболическую активность человека (усвоение холестерина, активность лактазы, выработку витаминов и т.д.) / <i>Resistance to destruction by hydrochloric acid of the stomach and bile salts of the small intestine. Adhesion to intestinal epithelial tissue. The ability to colonize the gastrointestinal tract. Modulation of immune responses. Producers of antimicrobial substances. Influence on human metabolic activity (cholesterol absorption, lactase activity, vitamin production, etc.).</i>
Технологичность / <i>Technological effectiveness</i>	Устойчивость к процессам технологической переработки. Масштабируемость от лабораторного к промышленному уровню. / <i>Resistance to technological processing. Scalability from laboratory to industrial level.</i>

Применение методов капсулирования клеток в Са-альгинатные гранулы открывает следующие возможности: дозирование микробов по видам и штаммам в своем микроконтейнере-носителе, комбинирование препаратов из нескольких носителей, использование микроконтейнера как биореактора, наполненного как самими микроорганизмами, так продуцируемыми ими метаболитами в т.ч. и с антибиотическими свойствами. Хорошим подспорьем в разработке технологии капсулирования живых клеток является наличие серийно выпускаемых лабораторных инкапсуляторов, которые дают возможность оптимизировать и масштабировать процесс приготовления удобных для персонализированного применения рецептурных форм пробиотиков, а также различных заквасок на основе симбиотических бактерий при получении ферментированной молочной продукции с пробиотическим потенциалом для ежедневного потребления [17].

Цель исследования: разработка способа капсулирования клеток симбиотических бактерий для создания новых форм пробиотических препаратов с лучшими возможностями по составлению смесей штаммов и пролонгированию их функциональной активности.

Материалы и методы

Микроорганизмы и условия их культивирования

В экспериментах использовали имеющиеся в лабораторной и учрежденческой коллекции «ГКПМ-Оболенск» культуры симбиотических микроорганизмов со статусом GRAS и выделенные нами из пищевых продуктов и отобранные по критерию антагонизма к кишечным патогенам: *Enterococcus faecium* 760 и 1073, *Enterococcus mundtii* B-7424 и 28, *Lactobacillus brevis* 917 и 1073, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei* 1020, *Lactobacillus plantarum* Угн3а и 1351, *Lactobacillus helveticus* ВФ, *Lactobacillus salivarius* Оп7/21, 1090 и Оп7/14, *Lactobacillus rhamnosus* EGO, *Propionibacterium freudenreichii* ПКБ_21, *Paenibacillus jamilae* B602, *Bacillus subtilis* СС-1 и ПСФ-19, *Bacillus amyloliquefaciens* 3-5 и ssp. *plantarum* ЛВП-20, *Bacillus mojavensis* 2-11, *Bacillus vallismortis* 3-3, *Bacillus lentus* B-7147 и др.

Лактобациллы и энтерококки культивировали на среде МРС (MRS, HiMedia, Индия) или на лактобакагаре (Лактобакагар, ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), бациллы – на гидролизате рыбной муки с 0,5% дрожжевого экстракта (ГРМ-агар, производство ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) при 30–37°C. При этом лактобациллы в зависимости от вида выращивали в микроаэрофильных либо анаэробных условиях. При выращивании в колбах использовали те же среды, но в виде бульона.

Определение антагонистической активности бактерий проводили методом отсроченного антагонизма и методом агаровых блоков (Фредерика) [18]. В качестве тестовых культур использовали бактерии из коллекции «ГКПМ-Оболенск».

Идентификацию перспективных штаммов осуществляли на основе фенотипических характеристик с использованием набора биохимических тестов API 50CHL, API rapid ID 2 STREP V2.0 и API 50CHB (bioMérieux, France), а чаще – по профилю рибосомальных белков с помощью системы Bruker

Daltonik MALDI TOF Biotyper. Обращалось внимание в первую очередь на микроорганизмы из группы молочнокислый бактерий, энтерококков и энтеробактерий.

Бактерии для опытов по высушиванию и капсулированию получали из биомассы, смытой с плотных питательных сред или же сконцентрированной из питательных бульонов на центрифуге, затем гомогенизированной до показателей оптической плотности не ниже 1 млрд взвеси по стандарту Л.А.Тарасевича.

Методы высушивания

Для целей сохранения штаммов и пополнения коллекций новыми изолятами использовали метод сублимационного высушивания с применением сахарозо-желатиновой защитной среды М.М.Файбича [19], а также экспериментальных вариантов, включающих лактозу, трегалозу, пептон, поливинилпирролидон, декстран, глутамат, тиомочевину и др. Сублимационное высушивание проводили на лиофилизаторе ВТ-4к Virtis (США), а распылительное – на лабораторной установке Mini Spray Dryer B-190 (Büchi, Швейцария). Остаточную влажность сухих образцов определяли на влагомере AND MF-50 (Япония).

Капсулирование микроорганизмов проводили как на лабораторном стенде, состоящем из инжектора, расходной и приемной емкости с мешалкой на штативе, так и с использованием профессиональной установки Encapsulator B-395 Pro (Büchi Labortechnik AG, Швейцария) (рис. 1) согласно ин-



Рис. 1. Лабораторная полуавтоматическая установка B-395 Pro Encapsulator швейцарской фирмы Büchi. Внешний вид в рабочем состоянии.

Fig. 1. Laboratory semi-automatic installation B-395 Pro Encapsulator of the Swiss company Büchi. Appearance in working order.

струкции и разработанным нами методическим рекомендациям [20]. Установка снабжена набором форсунок с диаметром сопла от 80 мкм до 1 мм. Принцип метода заключается во внесении смеси бактериальных клеток с альгинатом натрия (AlgNa) через иголку шприца либо форсунку по каплям в полимеризующий раствор – 0,9% (0,1 М) CaCl₂ с добавлением Твин20, где и формируются капсулы (гранулы) сферической формы. Для приготовления технологических растворов использовали безводные CaCl₂ и NaCl (хч), неионный ПАВ Твин20 («Сигма») и альгиновокислый натрий («Реахим»). Все растворы готовили на деионизованной воде с удельным сопротивлением 18,2 МОм•см и дополнительно фильтровали. Стерилизовали растворы автоклавированием в стандартных условиях. Водные растворы альгината натрия после автоклавирования очищали от деструктурированных фракций центрифугированием при 2000 g в течение 10 мин, осадок удаляли. После очистки для 3%-го раствора сухой остаток вещества составлял 2,6 ± 0,2%. Через 8–10 мин после окончания процесса полимеризации капсулы/гранулы вынимали из полимеризующего раствора и переносили в стерильный физраствор с 10 мМ CaCl₂. Полученную взвесь отмытых капсул переносили в пластиковую пробирку с закручивающейся крышкой и хранили при температуре 4°C до использования. Все эксперименты проводили в асептических условиях.

Для определения размеров капсул применяли линейку и лазерный дифракционный гранулометр MicroTес Plus фирмы «Фрич» (Германия). При измерении с помощью линейки гранулы выкладывали по 10 штук на стороне шкалы со штрихами от нулевой отметки, фиксировали суммарное значение и его делением на 10 определяли средний диаметр. Морфологию капсул оценивали просмотром в световом микроскопе Eclipse E200 (Nikon, Китай) при минимальном увеличении и с помощью цифрового микроскопа MSZ-APO-V (Correct, Япония).

В качестве способа **микрогранулирования** живых бактерий использовали метод распылительного высушивания на BUCHI Mini Spray Dryer B-190 (Швеция) в ручном экспериментальном режиме.

Декапсулирование образцов

Определение количества живых клеток в гранулах проводили после их раскрытия (декапсулирования). Для этого из пластиковых пробирок миниатюрной ложечкой отбирали по 200 мкл взвеси капсул, переносили в пробирку с 1 мл 1–2%-го раствора цитрата натрия (в зависимости от размера капсул) и выдерживали 30–60 мин для растворения оболочек [21].

Пробы после высушивания вначале регидратировали в физрастворе. Из декапсулированных образцов отбирали по 0,5 мл суспензии, серийно разводили в пробирках с физраствором и высевали на чашки с подходящим питательным агаром. Чашки с посевами выращивали в термостате при 30–37° в течение 24–48 ч с последующим подсчетом числа КОЕ.

Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами корреляционного и дисперсионного анализа [22].

Результаты исследования и их обсуждение

Для исследований по разработке новых форм капсулированных пробиотиков были использованы различные виды симбиотических микроорганизмов – лактобацилл (*L. brevis*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius* и др.), лакто-, энтерококков (*Lactococcus lactis*, *E. faecium*, *E. mundtii* и др.), *Escherichia coli*, пропионовокислых бактерий (*P. freudenreichii*) и спорообразующих бацилл (*B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. lentus*).

На распылительной установке Mini Spray Dryer B-190 и в лиофилизаторе ВТ-4к Virtis в сравнительном эксперименте было высушено по 2 образца свежеприготовленной взвеси *L. plantarum*, приготовленной с использованием различающихся по составу защитных сред.

Сухие образцы, высушенные методом распыления, имели вид мелких (1,0–1,5 мм) рассыпчатых гранул, хорошо растворимых в воде. Сухие образцы, высушенные лиофилизацией, имели вид капиллярно-пористой массы. Для определения концентрации живых клеток из них на физрастворе были приготовлены взвеси, соответствующие примерно 10 млрд КОЕ по стандарту мутности Л.И.Тарасевича, разведены в 10⁹ раз и посеяны на чашки с лактобакагаром. Данные по концентрации живых клеток в образцах после распылительного и сублимационного высушивания представлены в табл. 2.

Выживаемость клеток после распылительного высушивания (табл. 2) была крайне мала, что неприемлемо для препаратов пробиотиков, в которых концентрация живых клеток должна быть не ниже 1,0 × 10⁶⁻⁷ на единицу массы или объема. Лиофилизация, как и следовало ожидать, дала существенно более высокие результаты по выживаемости. Однако в результате получения таблеток из лиофилизатов, где задействуются такие технологические процессы, как измельчение сухой массы, влажное гранулирование, смешение с наполнителями, прессование, сопровождающиеся

Табл. 2. Концентрация живых клеток штамма *Lactobacillus plantarum* после распылительного и сублимационного высушивания проб

Table 2. Concentration of live cells of *Lactobacillus plantarum* strain after spray and freeze drying of samples

Пробы и защитные среды / Samples and protective media	Количество КОЕ/мл в пробах до после высушивания / The amount of CFU/ml in samples before and after drying				
	До сушки / Before drying	После сушки / After drying		Выживаемость, % / Survival rate, %	
		Распылом / Sprayer	Сублимацией / Sublimation	Распылом / Sprayer	Сублимацией / Sublimation
№5 (ТГ)*	2,6 × 10 ⁹	9,5 × 10 ⁵	1,45 × 10 ⁹	0,04	55,7
№6 (ТГПе)*	2,4 × 10 ⁹	6,8 × 10 ⁵	1,22 × 10 ⁹	0,03	50,4

*Т – трегалоза, Г – глутамат, Пе – пептон / *T – trehalose, G – glutamate, Pe – peptone.

Табл. 3. Характеристики Са-альгинатных гранул, полученных на лабораторном стенде
 Table 3. Characteristics of Ca-alginate granules obtained at the laboratory stand

Культуры бактерий включенных в гранулы / Cultures of bacteria included in the granules	Средний диаметр гранул, мм / Average diameter of granules, mm	Средний объем гранул, мкл* / Average volume of granules, μl^*	КОЕ**/ гранулу / CFU**/ granule
<i>P. freudenreichii</i> ПКБ_21	2,9	12,8	$1,1 \times 10^5$
<i>E. coli</i> M17	4,6	50,8	$2,0 \times 10^8$
<i>E. mundtii</i> 28	4,4	44,5	$9,2 \times 10^5$
<i>B. lentus</i> ПС-1	2,8	11,5	$1,3 \times 10^5$
<i>L. plantarum</i> Урл3а	2,95	13,4	$3,4 \times 10^5$
<i>L. rhamnosus</i> EGO	3,2	17,2	$2,7 \times 10^5$
<i>L. helveticus</i> ВФ1	3,3	18,8	$2,8 \times 10^5$
<i>L. fermentum</i> П21	3,25	17,9	$5,6 \times 10^5$
<i>L. acidophilus</i> АВ	3,6	24,4	$6,1 \times 10^5$

* Расчет объема гранул проводили по формуле: $V = 4/3 \times \pi \times R^3$; ** колониеобразующие единицы определяли высевом пробы из 10 распущенных с помощью цитрата натрия гранул на питательный агар (для лакто- и пропионовокислых бактерий – на МРС-агар, для остальных – на ГРМ-агар) с пересчетом на объем единичной гранулы.

*The calculation of the volume of granules was carried out according to the formula: $V = 4/3 \times \pi \times R^3$; **colony-forming units were determined by seeding a sample of 10 granules dissolved with sodium citrate on nutrient agar (for lacto- and propionic acid bacteria – on MRS-agar, for the rest – on GRM-agar) with conversion to volume of single granule.

воздействиями экстремальных факторов, в т.ч. и кислорода, потери в живых клетках могут быть десятикратными. Поэтому было важно определить практические возможности метода микрокапсулирования живых микроорганизмов – продуцентов антимикробных субстанций и обладающих свойствами пробиотиков – как альтернативного использования многостадийной обработки живых клеток.

В результате проведенных экспериментов был разработан метод капсулирования штаммов симбиотических бактерий в Са-альгинатные гранулы заданного размера и определены их основные свойства.

Метод состоит в смешивании свежеполученной микробной суспензии (не менее 1 млрд живых клеток/мл) с 3%-м раствором альгината натрия (1:1 по объему), гомогенизации смеси и введении ее по каплям через диспенсер (форсунку) в емкость с раствором 0,9% CaCl_2 при непрерывном помешивании. В опытах на модельном стенде внутренний диаметр иглы был 0,3 и 0,7 мм, а на Encapsulator В-395 использовали форсунки с отверстием 80, 150 и 300 мкм.

Было установлено, что полученные на модельном стенде образцы Са-альгинатных гранул отличаются механической прочностью, упругостью, имеют средний объем 23,3 мкл и в них может содержаться от 105 до 108 клеток, в среднем $(4 \pm 2) \times 10^5$ (табл. 3, рис. 2). Морфологически капсулы с пробиотиками (независимо от того, получены они на модельном стенде или на профессиональном инкапсуляторе) представляют собой округлые, почти сферические частицы с визуально неопределяемой оболочкой, «нафаршированные» равномерно распределенными по объему бактериальными клетками (рис. 2, 3).

Результаты выполненных исследований по изготовлению на Encapsulator В-395 лабораторных образцов Са-альгинатных гранул с пробиотиками и определению их свойств представлены в табл. 4 и на рис. 3.

При исследовании антагонистической активности Са-альгинатных гранул с иммобилизованными бактериями установлено следующее. В большинстве случаев гранулы, будучи непосредственно наложенными на газоны тест-штаммов, не давали антимикробной активности. Ее отсут-

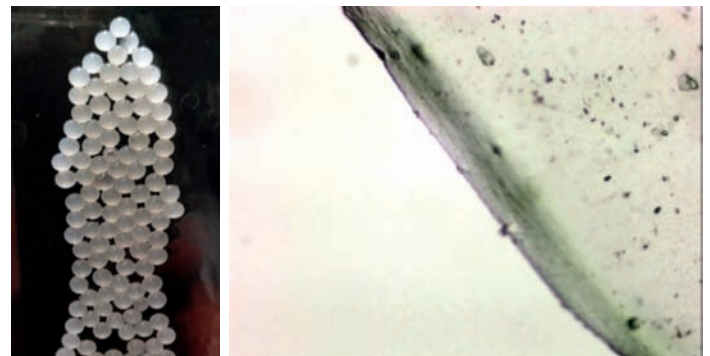


Рис. 2. Внешний вид препарата Са-альгинатных гранул с пропионовокислыми бактериями, полученных на лабораторном стенде (слева, увеличение $\times 2$), и край гранулы, внутри которой видны клетки бактерий (справа, увеличение $\times 600$).

Fig. 2. Appearance of the preparation of Ca-alginate granules with propionic acid bacteria, obtained on the laboratory stand (left, magnification $2 \times$) and the edge of the granule, inside which bacterial cells are visible (right, magnification $600 \times$).

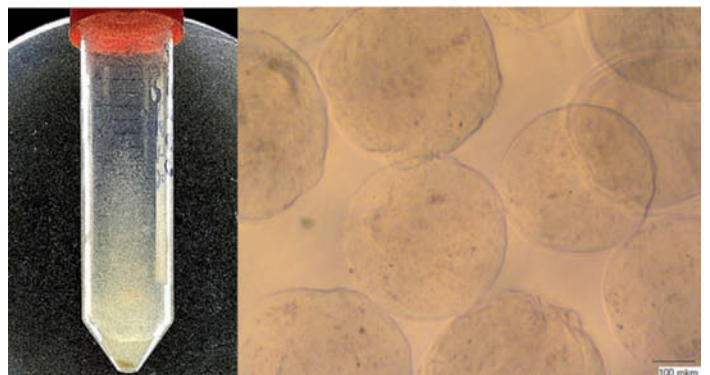


Рис. 3. Внешний вид препарата Са-альгинатных гранул с пропионовокислыми бактериями, полученных на Encapsulator В-395 с форсункой 150 мкм: пробирка с препаратом (слева), микрофотография гранул с *P. freudenreichii* (справа, снято на цифровом микроскопе MSZ-APO-V).

Fig. 3. Appearance of the preparation Ca-alginate granules with propionic acid bacteria obtained on the Encapsulator В-395 with a $150 \mu\text{m}$ nozzle: a test tube with the preparation (left), The micrograph of granules with *Pr. freudenreichii* (on the right, taken with a digital microscope MSZ-APO-V).

Табл. 4. Показатели образцов Са-альгинатных гранул с пропионовокислыми бактериями и лактобациллами, приготовленных на Encapsulator B-395

Table 4. Indicators of samples of Ca-alginate granules with propionic acid bacteria and lactobacilli prepared on the Encapsulator B-395

Диаметр сопла фор-сунки, мкм / Fore nozzle diameter, micron	Содержание альгината вес./ об.% / Alginate content w/v%	Культура микроорганизма / Culture of microorganism	Характеристики образцов гранул / Characteristics of pellet samples		
			Значение КОЕ, $T \times 10^{-7}$ в 1 мл капсул / CFU value, $T \times 10^{-7}$ in 1 ml of capsules	Размер основной фракции (мода), мкм / Main fraction size (mode), μm	Средний выход из одного опыта, мл / Average output from one experiment, ml
80	1,5	<i>P. freudenreichii</i>	30,8 ± 10	155 ± 5	20
		<i>L. helveticus</i>	13,9 ± 12,1	154 ± 15	18
	3	<i>P. freudenreichii</i>	26,5 ± 5,5	160 ± 3	19
		<i>L. helveticus</i>	6,5 ± 6,1	154 ± 15	20
150	1,5	<i>P. freudenreichii</i>	57 ± 30	340 ± 30	18
		<i>L. helveticus</i>	39,5 ± 32	320 ± 20	20
	3	<i>P. freudenreichii</i>	25 ± 23	411 ± 20	20
		<i>L. helveticus</i>	35,8 ± 30	405 ± 5	20
300	1,5	<i>P. freudenreichii</i>	26 ± 20	800 ± 20	15
		<i>L. helveticus</i>	25,8 ± 21	885 ± 15	20
	3	<i>P. freudenreichii</i>	13,6 ± 4,1	812 ± 40	20
		<i>L. helveticus</i>	14,5 ± 7	843 ± 20	20

ствие могло быть связано с тем, что бактерии в гранулах находились в состоянии дефицита питания. Если это так, то предварительная инкубация гранул в питательном бульоне должна активировать клеточный метаболизм, результатом которого могло быть появление антимикробной активности.

Действительно, после прединкубации образцов гранул, содержащих пропионовокислые бактерии (ПКБ), *B. lentus* (BL), *E. mundtii* (Em 28) и *L. plantarum* (Lp), вокруг них на питательной среде наблюдалась заметная зона отсутствия роста тест-штаммов (рис. 4 а, б).

Еще одна интересная особенность была свойственна гранулам с *B. lentus*. Если исходная смесь (клетки в растворе натриевой соли альгиновой кислоты) была активна против *Listeria monocytogenes* и *E. coli*, то полученные из нее грану-

лы подавляли лишь листерии (рис. 4 б, в). Это можно объяснить тем, что в микроаэрофильных условиях строгие аэробы *B. lentus* не могли производить метаболиты, ингибирующие рост грамотрицательных эшерихий, либо их было мало.

Выявленная закономерность свидетельствует о возможности использования гранул с иммобилизованными полезными бактериями в качестве микробиореакторов. Они, достигнув нижних отделов кишечника, способны инициировать продукцию антимикробных видоспецифических метаболитов.

Проведены эксперименты по обезвоживанию Са-альгинатных гранул с использованием методов сублимационного и конвективного высушивания. После сушки наблю-

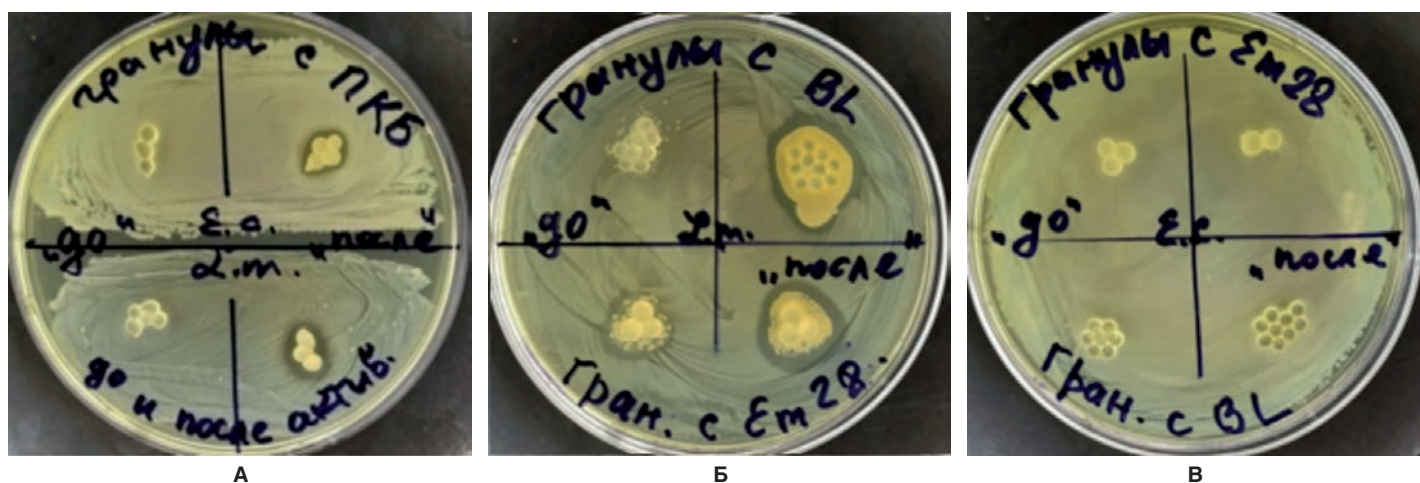


Рис. 4. Результаты тестирования антимикробной активности Са-альгинатных гранул с монокультурами бактерий.

Fig. 4. Results of testing the antimicrobial activity of Ca-alginate granules with bacterial monocultures.

* А – гранулы с пропионовокислыми бактериями (ПКБ), наложенные на газоны тест-штамма *E. coli* (E.c.) и *L. monocytogenes* (L.m.); Б – гранулы с *B. lentus* (BL) и *E. mundtii* 28 (Em 28), наложенные на газон тест-штамма *L. monocytogenes*; В – то же, как в Б, но с тест-штаммом *E. coli*. Во всех чашках: «до» – исходные гранулы; «после» – гранулы, активированные путем 5 мин инкубации в питательном бульоне.

*A – granules with propionic acid bacteria (PBC) applied to the lawns of the *Escherichia coli* (E.c.) and *Listeria monocytogenes* (L.m) test strains; B – granules with *Bacillus lentus* (BL) and *Enterococcus mundtii* 28 (E.m 28) applied to the lawns of the *L. m.* test strain; C – the same as in B, but with the test strain E.c. In all cups: “before” – the initial granules; “after” – activated granules by 5 min. incubation in nutrient broth.

Табл. 5. Сохраняемость влажных Са-альгинатных гранул при температуре 4–7°C и влияние способа раскрытия гранул
 Tab. 5. Preservation of wet Ca-alginate granules at a temperature of 4–7°C and the influence of the method of opening the granules

№№	Активное начало и дата получения / Active start and date of receiving	Способ раскрытия гранул / Granule opening method	Количество живых клеток, КОЕ/мл в 10 гранулах / The number of living cells, CFU / ml in 10 granules	
			Исходное Initial	Конечное final
1	<i>E. coli</i> M17 01.09.21	Обработка цитратом натрия* / Treatment with sodium citrate*	6 × 10 ⁹	7 × 10 ⁴
		Обработка Полисорбом** / Treatment with Polysorb**		5 × 10 ⁶
2	<i>Lb. plantarum</i> 27.08.21	Обработка цитратом натрия / Treatment with sodium citrate*	2,9 × 10 ⁸	3 × 10 ³
		Обработка Полисорбом / Treatment with Polysorb**		1 × 10 ⁵
3	<i>Ent. mundtii</i> 28 14.09.21	Обработка цитратом натрия / Treatment with sodium citrate*	3,1 × 10 ⁸	1 × 10 ⁶
		Обработка Полисорбом / Treatment with Polysorb**		6 × 10 ⁷

*по методике МЛ 78095326-082-2022 (на 10 гранул во флаконе на 10 мл добавить 2 мл 2%-го раствора цитрата натрия, перемешать до полного их растворения);
 **на 10 гранул во флаконе добавить «Полисорб МП» (Россия, Челябинск) до покрытия слоем, не менее чем в 2 раза по высоте превышающим их диаметр и встряхивать не менее 60 мин до полного распада.

*according to the method ML 78095326-082-2022 (for 10 granules in a 10 ml vial, add 2 ml of 2% sodium citrate solution, stir until they are completely dissolved);

** add Polysorb MP (Russia, Chelyabinsk) to 10 granules in vial until coated with a layer of at least 2 times their diameter in height and shake for at least 60 minutes. until complete collapse.

дается изменение формы и размера гранул: из сферических они становятся угловатыми, напоминающими семена пшеницы, мака и в 1,35 ± 0,2 раза (на 26% в среднем) уменьшаясь в диаметре. Однако эти изменения были не критичными для жизнеспособности инкапсулированных культур: потери по живым клеткам варьировали в пределах порядка.

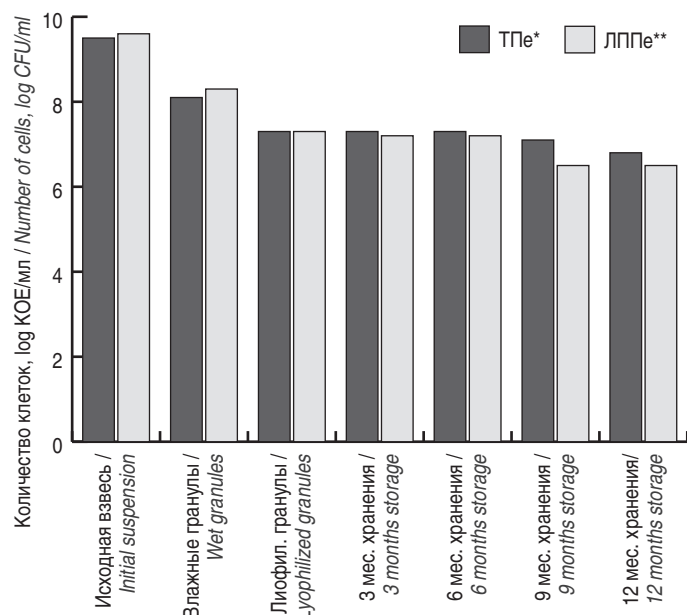


Рис. 5. Изменение количества живых клеток в процессе получения на лабораторном стенде Са-альгинатных гранул с *Propionibacterium freudenreichii*, их лиофилизации и последующего хранения.

Fig. 5. Change in the number of living cells in the process of obtaining Ca-alginate granules with *Propionibacterium freudenreichii* on the laboratory stand, the lyophilization and subsequent storage.

№6* – образец гранул, высушенных с использованием защитной среды на основе трегалозы (Т) и пептона (Пе); №7** – то же основе лактозы (Л), поливинилпирролидона 90000 (П) и пептона (Пе).

No 6* – the sample of granules dried using a protective medium based on trehalose (T) and peptone (Pe); No 7** – the same based on lactose (L), polyvinylpyrrolidone 90000 (P) and peptone (Pe).

Наблюдение за выживаемостью образцов лиофилизированных гранул после года хранения при температуре 6 ± 2°C, как видно из рис. 5, показало, что концентрация живых клеток пропионовокислых бактерий была выше в пробах, где в качестве стабилизатора использовалась трегалоза (№6), а не лактоза (№7).

На хранение были оставлены и влажные Са-альгинатные гранулы с живыми бактериями в дистиллированной воде. Вопреки ожиданиям, микроорганизмы в них весьма неплохо сохранились (рис. 6). Наиболее высокие показатели по количеству живых клеток были у гранул, содержащих бациллы, энтерококки и пропионовокислые бактерии. Далее, по убыванию, следовали кишечная палочка и лактобациллы.

Установлено, что на величину оценки жизнеспособности бактерий во влажных гранулах имеет значение и способ ее определения. Так, в сравнительных экспериментах, где наряду с цитратом натрия, известным «разрушителем» Са-альгинатных гранул, применение в этих же целях препарата «Полисорб ПМ», представляющего собой дисперсный диоксид кремния, приводило к более высоким показателям жизнеспособности бактерий (табл. 5).

Но как раскрыть Са-альгинатные гранулы для выхода из них бактерий? При смешивании влажных гранул с фармпрепаратом «Полисорб ПМ» (дисперсный диоксид кремния, который используется для купирования детоксикаций при отравлениях и аллергиях) происходил их постепенный распад с высвобождением клеток. По сравнению с известным «разрушителем» Са-альгинатных гранул, применение в этих же целях Полисорба приводило к более высоким показателям по оценке количества жизнеспособных клеток в образцах (табл. 5). Полученные данные по удовлетворительной сохраняемости бактерий в Са-альгинатных гранулах дают основания для разработки инновационной формы пробиотического препарата с живыми функционально-активными штаммами симбиотических бактерий. Например, жидкая форма пробиотика BioGaia® (Швеция) на основе *Lactobacillus reuteri*

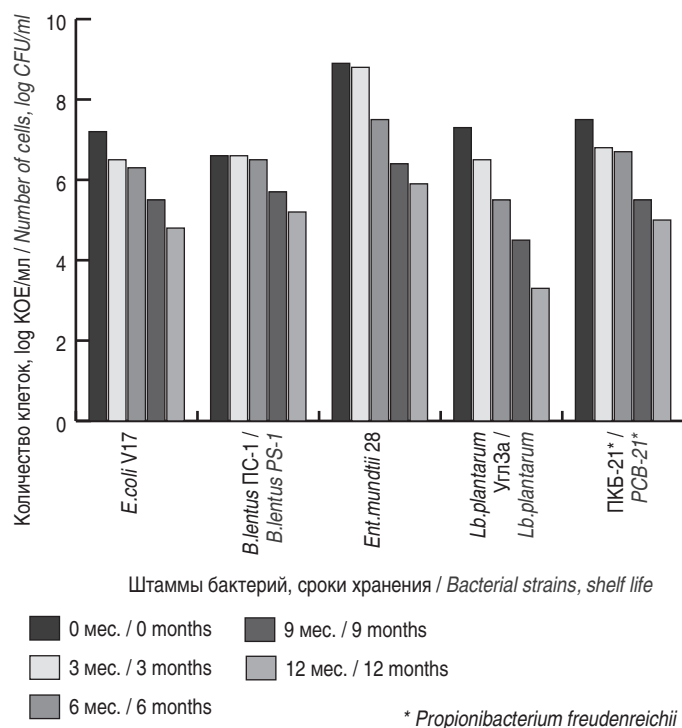


Рис. 6. Сравнительная динамика изменения концентрации живых бактерий во влажных Са-альгинатных гранулах после хранения при температуре $6 \pm 2^\circ\text{C}$ в зависимости от вида штамма.

Fig. 6. Comparative dynamics of changes in the concentration of live bacteria in wet Ca-alginate granules after storage at a temperature of $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$, depending on the type of strain.

имеет срок хранения всего 2,5 мес. В наших же экспериментах срок годности большинства образцов препаратов с живыми капсулированными бактериями достигает полугодика (рис. 6, табл. 5). Технические решения, требующиеся для доведения такого препарата до готовой лекарственной формы, не составят существенной проблемы.

Результаты исследования и их обсуждение

Более чем 70-летняя история применения пробиотиков свидетельствует о несомненной их пользе для здоровья, поскольку они обеспечивают естественную защиту организма от желудочно-кишечных расстройств и воспалительных процессов, вызываемых бактериальными патогенами [1, 6]. Пробиотики для медицинского применения согласно Государственной фармакопее выпускают в различных лекарственных формах: лиофилизаты во флаконе, суспензии, таблетки, капсулы, порошки, суппозитории [18]. Если первые подвергаются воздействию лишь факторов замораживания и высушивания, то для получения таблеток сухую биомассу затем еще измельчают, смешивают с наполнителями, гранулируют с частичным увлажнением и прессуют. Немного короче технологическая цепочка при получении капсулированных форм, заканчивающаяся фасовкой порошков в пластиковые емкости. Эти технологические процессы сопровождаются действиями кислорода, механических сдвиговых усилий, что приводят к потерям жизнеспособности клеток бактерий, порой существенным. Все это, а также необходимость регидратации, сказывается на эффективности сухих форм препаратов при целевом применении.

На этом фоне более выигрышной является суспензионная форма, представляющая собой взвесь бактерий, слитой с ферментера и стабилизированной разбавителями. Однако к ее минусам следует отнести весьма ограниченные сроки хранения. Поэтому актуальным остается поиск новых форм пробиотиков с лучшими возможностями по составлению штаммовых композиций, защите клеток от внешних воздействий, а также с более высокой их жизнеспособностью, в применении не требующих дополнительной реактивации. Все эти преимущества могли бы быть реализованы при создании форм пробиотиков, иммобилизованных на биосовместимых носителях, таких как, например, природные полисахариды – альгинаты [6, 14, 15, 23, 24].

Технология микрокапсулирования живых микроорганизмов дает возможность использовать не только строго отобранные по всем правилам штаммы пробиотиков (табл. 1), но и другие, с более широкими возможностями по продукции полезных метаболитов. Примером может быть использование штаммов *B. subtilis*, хорошо известных в ветеринарии благодаря высокой эффективности за счет продукции множества ферментов и бактериоцинов [25–27]. Благодаря этому пробиотик на основе *B. subtilis* под названием «Биоспорин» стали выпускать и для людей с кодом «A07FA Антидиарейные микроорганизмы» [28].

Исследована сохраняемость микроорганизмов в составе влажных и лиофилизированных гранул в течение года в условиях бытового холодильника, что дает надежду на создание жидкой функционально активной формы капсулированного пробиотика с ценой ниже известных аналогов.

В перспективе для повышения стабильности Са-альгинатных гранул с живыми симбионтами при прохождении через желудочно-кишечный тракт можно создавать вокруг них дополнительные оболочки, используя, например, хитозан и полилизин [29–31].

Заключение

В результате проведенных экспериментов был разработан метод капсулирования штаммов симбиотических бактерий в Са-альгинатные гранулы заданного диапазона размеров и определены их основные свойства. Объектами капсулирования были представители различных видов молочнокислых микроорганизмов, кишечные эшерихии, пропионовокислые бактерии и бациллы.

Определены условия обезвоживания влажных гранул с использованием лиофилизации, обеспечивающей сохранение рекомендованного количества жизнеспособных бактерий – не менее 10^6 КОЕ в дозе.

Показано, что гранулы с иммобилизованными бактериями способны производить в них антимикробные видоспецифические метаболиты.

В целом проведенные исследования указывают на следующие перспективы, которая предоставляет технология Са-альгинатных гранул с живыми симбионтами: 1) получение оригинальных рецептур из перспективных заготовок штаммов в виде монопрепаратов под конкретную симптоматику и с учетом индивидуальных особенностей пациентов; 2) доступность и высокая достоверность контроля биологической активности монопрепаратов как основы для составления

композиций «в одном флаконе»; 3) применение в комплексном препарате набора гранул, наполненных как живыми бактериями, так и метабитами – ферментами, короткоцепочечными жирными кислотами, бактериоцинами; 4) высокая сохраняемость клеток как во влажных, так и в высушенных гранулах, что будет способствовать доставке функционально активного препарата в нижние отделы кишечного тракта, где локализуются ключевые представители микробиома и разворачивается основное «поле битвы» за пищу. Наконец, такого рода препараты толерантны и удобны в применении – «положи в рот и запей».

Намечены подходы по раскрытию гранул с освобождением бактерий *in vivo* в случае необходимости.

Область применения результатов – препаратостроение: новые формы инкапсулированных про- и метабитиков с улучшенными возможностями по функциональному составу и дозировке, спектру активности против кишечных патогенов, целевой доставке, пролонгированной жизнеспособности и персональному использованию.

Область применения продукта – медицина, ветеринария и пищевая индустрия.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора по теме №080 «Получение инкапсулированных препаратов для борьбы с бактериальными патогенами на основе штаммов, обладающих пробиотическими свойствами».

Financial support

The work was carried out within the framework of the industry program of Federal service on the topic No 080 «Obtaining encapsulated drugs to combat bacterial pathogens based on strains with probiotic properties».

Конфликт интересов

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

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

1. Кайбышева ВО, Никонов ЕЛ. Пробиотики с позиции доказательной медицины. Доказательная гастроэнтерология. 2019;8(3):45-54. / Kaibysheva VO, Nikonov EL. Probiotics from the standpoint of evidence-based medicine. Russian Journal of Evidence-Based Gastroenterology. 2019;8(3):45-54. DOI: 10.17116/dokgastro2019803145 (In Russian).
2. Kaplan Y, Reich S, Oster E, Maoz S, Levin-Reisman I, Ronin I, et al. Observation of universal ageing dynamics in antibiotic persistence. Nature. 2021 Dec;600(7888):290-294. DOI: 10.1038/s41586-021-04114-w
3. Halloran K, Underwood MA. Probiotic mechanisms of action. Early Hum Dev. 2019 Aug;135:58-65. DOI: 10.1016/j.earlhumdev.2019.05.010
4. Gardiner GE, O'Sullivan E, Kelly J, Auty MA, Fitzgerald GF, Collins JK, et al. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. Appl Environ Microbiol. 2000 Jun;66(6):2605-12. DOI: 10.1128/AEM.66.6.2605-2612.2000
5. Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. Biotechnol Prog. 2007 Mar-Apr;23(2):302-15. DOI: 10.1021/bp060268f
6. Mitropoulou G, Nedovic V, Goyal A, Kourkoutas Y. Immobilization technologies in probiotic food production. J Nutr Metab. 2013;2013:716861. DOI: 10.1155/2013/716861
7. Orive G, Hernández RM, Rodríguez Gascón A, Calafiore R, Chang TM, de Vos P, et al. History, challenges and perspectives of cell microencapsulation. Trends Biotechnol. 2004 Feb;22(2):87-92. DOI: 10.1016/j.tibtech.2003.11.004
8. Rajam R, Subramanian P. Encapsulation of probiotics: past, present and future. J Basic Appl Sci (2022)11. DOI: 10.1186/s43088-022-00228-w
9. Sidira M, Galanis A, Ypsilantis P, Karapetsas A, Progaki Z, Simopoulos C, et al. Effect of probiotic-fermented milk administration on gastrointestinal survival of *Lactobacillus casei* ATCC 393 and modulation of intestinal microbial flora. J Mol Microbiol Biotechnol. 2010;19(4):224-30. DOI: 10.1159/000321115
10. Heidebach T, Först P, Kulozik U. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. Crit Rev Food Sci Nutr. 2012;52(4):291-311. DOI: 10.1080/10408398.2010.499801
11. Heidebach T, Först P, Kulozik U. Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. International Dairy Journal. 2009; 19(2):77-84.
12. Doherty SB, Gee VL, Ross RP, Stanton C, Fitzgerald GF, Brodkorb A. Efficacy of whey protein gel networks as potential viability-enhancing scaffolds for cell immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* GG. J Microbiol Methods. 2010 Mar;80(3):231-41. DOI: 10.1016/j.mimet.2009.12.009
13. Nedovic V, Kalusevic A, Manojlovic V, Levic S, Bugarski B. An overview of encapsulation technologies for food applications. Procedia Food Science. 2011.1806-1815.
14. Afzaal M, Saeed F, Ateeq H, Akhtar MN, Imran A, Ahmed A, et al. Probiotics encapsulated gastroprotective cross-linked microgels: Enhanced viability under stressed conditions with dried apple carrier. Food Sci Nutr. 2022 Nov 4;11(2):817-827. DOI: 10.1002/fsn3.3116
15. Burgain J, Gaiani C, Linder M, Scher J. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial application. Journal of Food Engineering. 2011;104(4):467-483.
16. Ouwehand C, Bianchi Salvadori B, Fondén R, Mogensen G, Salminen S, Sellars R. Health effects of probiotics and culture-containing dairy products in humans. Bulletin International Dairy Federation. 2003;380:4-19.
17. Encapsulator B-395 Pro. Operation Manual (www.buchi.com/PB_11593484_B-395_en.pdf).
18. Общая фармакопейная статья «Пробиотики» ОФС.1.7.1.0008.15 Министерства здравоохранения РФ (<http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>). / Obshchaya farmakopeinaya stat'ya «Probiotiki» OFS.1.7.1.0008.15 Ministerstva zdravookhraneniya RF (<http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>). (In Russian).
19. Файбич ММ. Стабилизация вакцинных препаратов в процессе высушивания и хранения. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1968;2:59-66. / Faibich MM. Stabilizatsiya vaktsinnykh preparatov v protsesse vysushivaniya i khraneniya. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 1968;2:59-66. (In Russian).
20. Методические рекомендации «Инкапсулирование клеток пробиотических микроорганизмов в альгинатную матрицу с использованием установки В-395 Pro Encapsulator (Buchi, Швейцария)». ФБУН ГНЦ ПМБ. 2022. / Metodicheskie rekomendatsii «Inkapsulirovanie kletok probioticheskikh mikroorganizmov v al'ginatnyuyu matritsu s ispol'zovaniem ustanovki B-395 Pro Encapsulator (Buchi, Shveysariya)». FBUN GNTs PMB. 2022. (In Russian).
21. МЛ 78095326-082-2022. Методика лабораторная «Раскрытие кальций-альгинатных капсул с иммобилизованными микроорганизмами». ФБУН ГНЦ ПМБ. 2022. / ML 78095326-082-2022. Metodika laboratornaya «Raskrytie kal'tsii-al'ginatnykh kapsul s immobilizovannymi mikroorganizmami». FBUN GNTs PMB. 2022. (In Russian).
22. Гордиенко МГ. Статистическая обработка результатов пассивного и активного экспериментов в биотехнологии. Изд. РГХТУ им. Менделеева. Москва.

2015. / Gordienko MG. Statisticheskaya obrabotka rezul'tatov passivnogo i aktivnogo eksperimentov v biotekhnologii. Izd. RGKhtU im. Mendeleeva. Moscow. 2015. (In Russian).
23. Похиленко ВД, Левчук ВП, Калмантаев ТА, Лиховидов ВЕ, Сахаров БВ. Микробиом и здоровье человека. Сборник научных трудов. Специальный выпуск: по материалам межрегиональной научно-практической конференции. Нижний Новгород. 2022; 403-408. / Pokhilenko VD, Levchuk VP, Kalmantaev TA, Likhovidov VE, Sakharov BV. Mikrobiom i zdorov'e cheloveka. Sbornik nauchnykh trudov. Spetsial'nyi vypusk: po materialam mezhhregional'noi nauchno-prakticheskoi konferentsii. Nizhnii Novgorod. 2022; 403-408.
24. Сомов АН, Похиленко ВД, Дунайцев ИА, Клыкова МВ, Чукина ИА. Капсулированные в альгинат пробиотики: получение и некоторые свойства. Биотехнология. 2022;38(5):44-52. / Somov AN, Pokhilenko VD, Dunaitsev IA, Klykova MV, Chukina IA. Kapsulirovannye v al'ginat probiotiki: poluchenie i nekotorye svoistva. Russian Journal of Biotechnology. 2022;38(5):44-52. (In Russian).
25. Похиленко ВД, Перельгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность. Химическая и биологическая безопасность. 2007;2-3:20-41. / Pokhilenko VD, Perelygin VV. Probiotiki na osnove sporoobrazuyushchikh bakterii i ikh bezopasnost'. Khimicheskaya i biologicheskaya bezopasnost'. 2007;2-3:20-41. (In Russian).
26. Parisot J, Carey S, Breukink E, Chan WC, Narbad A, Bonev B. Molecular mechanism of target recognition by subtilin, a class I lanthionine antibiotic. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Feb;52(2):612-8. DOI: 10.1128/AAC.00836-07
27. Сидорова ТМ, Асатурова АМ, Хомяк АИ. Биологически активные метаболиты *Bacillus subtilis* и их роль в контроле фитопатогенных микроорганизмов. Сельскохозяйственная биология. 2018;53(1):29-37. / Sidorova TM, Asaturova AM, Homyak AI. Biologically active metabolites of *Bacillus subtilis* and their role in the control of phytopathogenic microorganisms. Agricultural Biology. 2018;53(1):29-37. DOI: 10.15389/agrobiology.2018.1.29rus (In Russian).
28. <https://www.gastroscan.ru/handbook/118/5648>
29. Cook MT, Tzortzis G, Charalampopoulos D, Khutoryanskiy VV. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. J Control Release. 2012 Aug 20;162(1):56-67. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.06.003
30. Yeung TW, Üçök EF, Tiani KA, McClements DJ, Sela DA. Microencapsulation in Alginate and Chitosan Microgels to Enhance Viability of *Bifidobacterium longum* for Oral Delivery. Front Microbiol. 2016 Apr 19;7:494. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00494
31. Ta LP, Bujna E, Antal O, Ladányi M, Juhász R, Szécsi A, et al. Effects of various polysaccharides (alginate, carrageenan, gums, chitosan) and their combination with prebiotic saccharides (resistant starch, lactosucrose, lactulose) on the encapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus casei* 01 strain. Int J Biol Macromol. 2021 Jul 31;183:1136-1144. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.170

Информация о соавторах:

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

Калмантаев Тимур Ахмерович, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Левчук Владимир Павлович, научный сотрудник отдела биотехнологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Сомов Алексей Николаевич, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Чукина Ирина Анатольевна, инженер отдела биотехнологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Igor A. Dunaitsev, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Department of Biological Technology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Timur A. Kalmantaev, PhD in Biological Sciences, Researcher of Department of biological technologies State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Vladimir P. Levchuk, Scientific Researcher of the Biotechnological's Technology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

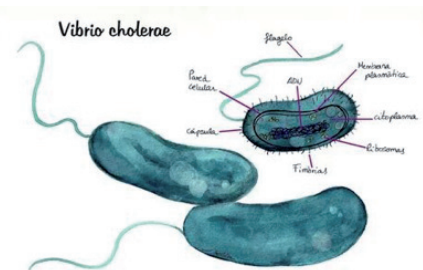
Alexey N. Somov, PhD (Physical-Chemistry), Senior Researcher, Laboratory of Anthrax Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Irina A. Chukina, Engineer of Department of Biological Technologies State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

НОВОСТИ НАУКИ

Роль D-аминокислот в стресс-индуцированном ответе у бактерий холеры

Чтобы исследовать благоприятные ниши, избегая при этом угроз, многие бактерии используют систему навигации по хемотаксису. Несмотря на десятилетия исследований хемотаксиса, большинство сигналов и сенсорных белков до сих пор неизвестны. Многие виды бактерий выделяют D-аминокислоты в окружающую среду; однако их функция остается в значительной степени непризнанной. Показано, что D-аргинин и D-лизин являются хемотаксическими репеллентными сигналами для возбудителя холеры *Vibrio cholerae*. Эти D-аминокислоты воспринимаются одним хеморецептором MCPDRK, транскрибируемым совместно с ферментом рацемазой, который синтезирует их под контролем сигма-фактора реакции на стресс RpoS. Структурная характеристика этого хеморецептора, связанного либо с D-аргинином, либо с D-лизином, позволила точно определить остатки, определяющие его специфичность. Специфичность этих D-аминокислот, по-видимому, ограничена теми ортологами MCPDRK, которые транскрипционно связаны с рацемазой. Эти результаты показывают, что D-аминокислоты могут формировать биоразнообразие и структуру сложных микробных сообществ в неблагоприятных условиях.



Irazoki O, Ter Beek J, Alvarez L, et al.

D-amino acids signal a stress-dependent run-away response in *Vibrio cholerae*.
Nat Microbiol. 2023 Aug;8(8):1549-1560. DOI: 10.1038/s41564-023-01419-6

Эколого-токсикологическая оценка воздействия компонентов ракетных топлив (диметилгидразина и авиационного керосина) на объекты окружающей среды

Г.А.Жариков, А.И.Марченко, О.А.Крайнова

ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, филиал «НИЦ токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов», п. Большевик, Московская область, Российская Федерация

Проведение экологического мониторинга природных экосистем и промышленных территорий позволяет оценить степень воздействия деятельности человека на окружающую среду и прогнозировать ее способность к самовосстановлению. Традиционно для эколого-токсикологической оценки территорий применяют химико-аналитические методы. Они дают «моментальный снимок» картины загрязненности природных объектов. Однако они не могут показать состояние экосистемы в целом, охватить весь спектр загрязнителей и их взаимодействие друг с другом (эффект «коктейля»). Для многих химических веществ не разработаны гигиенические нормативы (предельно допустимые концентрации, пороговые дозы и т.п.), по которым можно оценить степень их воздействия на человека и окружающую среду. Одним из эффективных методов определения загрязненности и суммарной (интегральной) токсичности почвы и воды может быть биотестирование, основанное на использовании специальных линий животных-биотестов (дафний, рыб, дождевых червей), растений, микробных тест-систем.

Проведена оценка острой и хронической токсичности проб воды и почвы, отобранных с территорий возле аэропортов АО «Домодедово» и АО «Шереметьево» (Москва), АО «Салехард», на космодроме «Байконур» (Казахстан). По результатам лабораторных исследований высокую чувствительность и избирательность к компонентам ракетных топлив показали: дафнии; люминесцирующие микроорганизмы на приборе «Биотокс-10М»; клетки водоросли хлореллы; из семян растений – редис и овес; ферментативная активность почв (гидролазная, дегидрогеназная).

Ключевые слова: авиационный керосин, биотестирование, дафнии, диметилгидразин-гептил, дождевые черви, овес, острая и хроническая токсичность, почвенные микроорганизмы, прибор «Биотокс-10М», редис, рыбы, фитотоксичность, хлорелла

Для цитирования: Жариков Г.А., Марченко А.И., Крайнова О.А. Эколого-токсикологическая оценка воздействия компонентов ракетных топлив (диметилгидразина и авиационного керосина) на объекты окружающей среды. Бактериология. 2023; 8(3): 26–35. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-26-35

Environmental and toxicological assessment of the impact of rocket fuel components (dimethylhydrazine and aviation kerosine) on environmental objects

G.A.Zharikov, A.I.Marchenko, O.A.Krainova

NRC Institute of Immunology FMBA of Russia – Branch RC Toxicology and Hygienic Regulation of Biopreparations, Serpukhov city district, Moscow region, Russian Federation

Conducting environmental monitoring of natural ecosystems and industrial areas makes it possible to assess the degree of impact of human activity on the environment and predict its ability to self-repair. Traditionally, chemical-analytical methods are used for the ecological and toxicological assessment of territories. They give, as it were, a "snapshot" of a picture of the contamination of natural objects. However, they cannot show the state of the ecosystem as a whole, study the entire range of pollutants and their interaction with each other (the "cocktail" effect), and for many chemicals no hygienic standards have been developed (maximum concentration limits, threshold doses, etc.), according to which can assess the degree of their impact on humans and the environment. One of the effective methods for determining the contamination and total (integral) toxicity of soil and water can be biotesting based on the use of special lines of animal bioassays (daphnia, fish, earthworms), plants, and microbial test systems.

Для корреспонденции:

Жариков Геннадий Алексеевич, доктор биологических наук, начальник отдела экологической биотехнологии Научно-исследовательского центра токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов – филиал ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства

Адрес: 142253, Московская область, г.о. Серпухов, п. Большевик, ул. Ленина, 102А

Телефон: (4967) 70-5238

Статья поступила 26.05.2023, принята к печати 29.09.2023

For correspondence:

Gennady A. Zharikov, PhD, DSc (Biological Sciences), Head of the Department of Ecological Biotechnology, Research Center for Toxicology and Hygienic Regulation of Biological Products – branch of the State Research Center «Institute of Immunology» of the Federal Medical and Biological Agency

Address: 102A Lenin str., Bolshhevik, Serpukhov city district, Moscow region, 142253, Russian Federation

Phone: (4967) 70-5238

The article was received 26.05.2023, accepted for publication 29.09.2023

The assessment of acute and chronic toxicity of water and soil samples taken from the territories of "Domodedovo" and "Sheremetyevo" airports (Moscow), Salekhard, at the Baikonur cosmodrome (Kazakhstan) was carried out. According to the results of laboratory studies, high sensitivity and selectivity to rocket fuel components were shown by: daphnia; luminescent microorganisms on the device "Biotoks-10M"; chlorella algae cells; from plant seeds – radishes and oats; soil enzymatic activity (hydrolase and dehydrogenase).

Key words: aviation kerosene, biotesting, daphnia, dimethylhydrazine – heptyl, earthworms, acute and chronic toxicity, soil microorganisms, Biotox-10M device, radish, fish, phytotoxicity

For citation: Zharikov G.A., Marchenko A.I., Krainova O.A. Environmental and toxicological assessment of the impact of rocket fuel components (dimethylhydrazine and aviation kerosene) on environmental objects. *Bacteriology*. 2023; 8(3): 26–35. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-26-35

Огромное количество химических веществ, используемых в сельском хозяйстве в виде пестицидов и гербицидов, а также промышленные выбросы и аварии на предприятиях ракетно-космической отрасли приводят к значительному загрязнению окружающей среды [1]. Учитывая, что для современного промышленного производства человеком введено в оборот свыше 100 млн синтетических химических соединений, трудно оценить масштабы их воздействия на окружающую среду [2].

Проведение экологического мониторинга природных экосистем и промышленных территорий позволяет оценить степень воздействия деятельности человека на окружающую среду и прогнозировать ее способность к самовосстановлению [3]. С учетом степени загрязнения почвы и воды разрабатывают перечень мероприятий по их очистке, чтобы предотвратить заболевания у людей, работающих или проживающих на этой территории.

Традиционно для эколого-токсикологической оценки территорий применяют химико-аналитические методы. Они дают «моментальный снимок» картины загрязненности природных объектов конкретными токсикантами. Однако они не могут отразить состояние экосистемы в целом, оценить весь спектр загрязнителей и их взаимодействие друг с другом (эффект «коктейля»). Кроме того, большими недостатками этих методов являются их высокая трудоемкость, необходимость приобретения высокоточного, дорогостоящего аналитического оборудования. Следует также помнить, что выявление даже всего спектра загрязнителей окружающей среды зачастую не позволяет судить об их токсичности для теплокровных животных и человека. Для многих химических веществ не разработаны гигиенические нормативы (предельно допустимые концентрации, пороговые дозы и т.п.), по которым можно оценить степень их воздействия на человека и окружающую среду.

Одним из эффективных методов определения загрязненности и суммарной (интегральной) токсичности почвы и воды может быть биотестирование, основанное на использовании животных-биотестов (дафний, рыб, дождевых червей), растений, микробных тест-систем.

Большое значение метод биотестирования приобретает при оценке безопасности территорий, загрязненных компонентами ракетных топлив и других токсичных химических веществ. Биотестирование обеспечивает мониторинг экологической безопасности территорий, позволяет достаточно быстро и эффективно оценить интегральную токсичность почвы, а также показать, что продукты разложения поллютантов являются малотоксичными для окружающей среды. Основная цель экономирования – регламентация

антропогенных воздействий на агроландшафт до уровня, который обеспечивает его функционирование, самоподдержание, самовосстановление и самоочищение его элементов в процессе рационального природопользования [4].

Применение биотестирования имеет ряд преимуществ перед физико-химическим анализом, средствами которого часто не удается обнаружить неустойчивые соединения или определить ультрамалые концентрации экотоксикантов, оценить генотоксичность загрязнений. Довольно часты случаи, когда выполненный современными средствами химический анализ не показывает наличия токсикантов, тогда как использование биологических тест-объектов свидетельствует об их присутствии в исследуемой среде. Биотестирование дает возможность быстрого получения интегральной оценки токсичности, что делает весьма привлекательным его применение при скрининговых исследованиях.

В отличие от биоиндикаторов, одним из основных требований к которым является толерантность, тест-объекты обычно выбирают среди видов, наиболее чувствительных к загрязняющим компонентам. Каждый из этих объектов имеет свои преимущества и ограничения, и ни один из организмов не может служить универсальным «тестером», одинаково чувствительным ко всем загрязняющим веществам. Опыт токсикологического нормирования показывает, что при использовании этих видов биотестированием может быть охвачено более 80% подлежащих контролю загрязняющих воду химикатов. При наличии определенного количества вредных веществ в анализируемой пробе животные сигнализируют о токсичности изменением своего физиологического состояния или смертью [4].

По чувствительности и степени изученности среди других тест-объектов выделяют дафний (*Daphnia magna*, *Daphnia pulex*) несколько видов микроскопических одноклеточных зеленых водорослей из класса протококковых (*Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella* sp.) и 5–6 видов рыб, как аквариумных (гуппи, данио-рерио), так и мелких аборигенных (голец, голянь).

Для биотестирования почвенных образцов обычно применяют дождевых червей, олигохет (кольчатых червей) и личинок различных насекомых.

Использование прибора «Биотокс-10М» (Россия) с микробным препаратом «ЭкоЛюм» позволяет проводить экспресс-тестирование проб почвы и воды на токсичность в течение короткого времени, с высокой точностью. Снижение (затухание) яркости биолюминесценции бактерий, регистрируемое прибором, позволяет с высокой точностью определять токсичность проб воды и водных вытяжек из почвы.

Изучение функциональной (ферментативной) активности микробного сообщества позволяет оценить токсическое воздействие компонентов ракетных топлив на аборигенную (естественную) микрофлору почвы и прогнозировать ее биологическую активность. Обычно такую оценку проводят по дегидрогеназной, гидролазной и целлюлазной активностям.

Медико-санитарное сопровождение и санитарно-эпидемиологический надзор за работами на объектах по утилизации вооружений Минобороны России и ликвидации аварий на космодромах Российского космического агентства является составной частью работы ФМБА России. Разработка нормативно-правового и методического обеспечения работ по биомониторингу и биотестированию почв на территориях аэропортов и космодромов является важным условием их эколого-гигиенической безопасности.

Осуществление комплекса мероприятий по эколого-токсикологической оценке почвы, загрязненной компонентами ракетных топлив, позволит снизить риск возникновения профпатологий у работников, занятых на работах по ликвидации аварийных запусков и при утилизации военной ракетной техники.

Цель настоящей работы: оценить острую и хроническую токсичность проб почвы и воды, отобранных возле аэропортов и космодрома, на различных тест-объектах.

Материалы и методы

Для проведения исследований был организован и круглогодично поддерживается в активном состоянии музей лабораторных линий животных-биотестов: дафний, рыб гуппи и данио-рерио, дождевых червей. Они имеют относительно короткий жизненный цикл развития, легко культивируются в лабораторных условиях.

Отбор проб почвы и воды проводили на территории аэропортов АО «Домодедово» (стоки 1 и 5 возле взлетной полосы; дер. Кутузово и река Гнилуша; южнее аэропорта водоем Журавлиная заводь), АО «Шереметьево» (водоотводный канал в Воскресенский ручей), АО «Салехард» (стоки 1, 2 и 3). Почву, загрязненную ракетным топливом (гептилом), отбирали на месте падения ракеты космического назначения «Протон-М», платформа 81, космодром «Байконур» (Казахстан).

Интегральную (суммарную) токсичность проб воды и экстрактов из почвы оценивали на лабораторной культуре пресноводного рачка *D. magna*. Биотестирование проводили в соответствии с нормативной документацией [5, 6]. Изучали острую (3-суточную) и хроническую (24-суточную) токсичность воды и водной вытяжки из почв.

Интегральную (суммарную) токсичность проб воды и экстрактов из почвы оценивали на лабораторных культурах рыб в соответствии с общепринятыми методическими рекомендациями [7–9]. Изучали острую (4-суточную) и хроническую (30-суточную) токсичность воды и водной вытяжки из почв.

Интегральную (суммарную) токсичность образцов почвы оценивали на лабораторной линии дождевых червей. Острую токсичность определяли в соответствии с ранее опубликованными рекомендациями [10–13].

Фитотоксичность почвы определяли по методу О.А.Берестецкого [14] согласно нормативной документации

[15] тестированием на семенах однодольных и двудольных растений. Наличие в исследуемой пробе фитотоксинов определяли по ростовым эффектам.

Фитотоксичность воды оценивали на лабораторной культуре хлореллы [16–17]. Основным показателем для оценки токсического действия служит угнетение роста количества клеток водорослей в опыте более чем на 20% по сравнению с контролем [18].

Определение интегральной токсичности воды и экстрактов из почвы проводили биолюминесцентным методом с использованием бактериального теста «ЭкоЛюм» на приборе «Биотокс-10М» [19, 20]. Критерием токсического действия считали снижение интенсивности биолюминесценции тест-объекта в исследуемой пробе более чем на 20% по сравнению с контрольной, не содержащей токсических веществ.

При определении дегидрогеназной активности почвы в качестве субстрата использовали бесцветный 2,3,5-трифенилтетразолий хлористый, который в анаэробных условиях в присутствии дегидрогеназы превращается в 2,3,5-трифенилформазан (ТФФ), имеющий красную окраску. Интенсивность окраски определяли фотокolorиметрически [21].

Общую гидролазную активность почвы определяли по реакции гидролиза флуоресцеин диацетата (ФДА) [22]. Оптическую плотность определяли колориметрированием при длине волны 490 нм.

Для определения целлюлозоразлагающей способности почвы применяли аппликационный метод: целлюлозный материал (фильтровальную бумагу) заложенный в почву, выдерживали в ней в течение 30 и 60 суток. По разнице в массе (%) фильтровальной бумаги до и после инкубации образцов судили об интенсивности целлюлолитической активности почвы [23].

Определение концентраций почвенных микроорганизмов проводили в соответствии с методикой [24], используя высев на чашки Петри с плотной питательной средой ферментативного гидролизата рыбной муки.

При работе с почвенными микроорганизмами соблюдали санитарно-эпидемиологические требования [25].

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с использованием пакетов прикладных программ Excel 7.0 и Statistica 10.0. Экспериментальные данные представляли в виде средних арифметических величин и их доверительных интервалов, рассчитанных с вероятностью 95%.

Результаты исследования и их обсуждение

1. Изучение чувствительности различных тест-животных и растений к компонентам ракетных топлив и нефтепродуктам

Проведена предварительная оценка чувствительности различных тест-животных (дафний, рыб гуппи и данио-рерио, дождевых червей), однодольных и двудольных растений (редиса, гороха, огурцов, овса, пшеницы и ржи), хлореллы, почвенных микроорганизмов, люминесцентного микробного препарата «ЭкоЛюм» на приборе «Биотокс-10М» для различных загрязнителей. В экспериментах по биотестированию использовали компоненты ракетных топлив: диметилгидразин (гептил), формалин (имитатор гептила), авиационный керосин, а также возможные сопутствующие загрязни-

Таблица 1. Сравнительная оценка чувствительности тест-животных к различным загрязнителям, LD₅₀ в мг/кг
 Table 1. Comparative assessment of the sensitivity of test animals to various pollutants, LD₅₀ in mg/kg

Тест-объекты / Test objects	Авиакеросин / Avia-kerosene	Ацетон / Acetone	Бензин / Petrol	Гептил / Heptyl	Дизельное топливо / Diesel fuel	Мазут / Fuel oil	Формалин / Formalin	Четыреххлористый углерод / Carbon tetrachloride	Оценка чувствительности в баллах / Sensitivity assessment in points
Дафнии / Daphnia	78	312	312	0,25	78	312	156	78	5
Дождевые черви / Earthworms	4100	20000	12500	-	7500	11 500	3000	160 000	3
Рыбы гуппи / Guppy fish	120	3,8	2	-	нет реакции / no reaction	нет реакции / no reaction	0,5	1	4
Рыбы данио-рерио / Zebrafish	120	1	-	-	нет реакции / no reaction	нет реакции / no reaction	0,17	-	4
Прибор «Биотокс-10М» на воде / Device "Biotox-10M" on water	218	290	302	-	250	212	13	13	5
Прибор «Биотокс-10М» на почве / Device "Biotox-10M" on soil	1640	2045	2321	-	1668	2122	752	879	3
Почвенные микроорганизмы / Soil microorganisms	10	10	10	-	10	10	10	10	нет индивидуальной реакции / no individual reaction

Таблица 2. Сравнительная оценка чувствительности семян растений к различным загрязнителям, EC₅₀ в г/кг почвы
 Table 2. Comparative assessment of the sensitivity of plant seeds to various pollutants, EC₅₀ in g/kg of soil

Тест-объекты / Test objects	Авиакеросин / Avia-kerosene	Ацетон / Acetone	Бензин / Petrol	Гептил / Heptyl	Дизельное топливо / Diesel fuel	Мазут / Fuel oil	Формалин / Formalin	Четыреххлористый углерод / Carbon tetrachloride	Оценка чувствительности в баллах / Sensitivity assessment in points
Редис / Radish	77–110	35–5	20–25	?	45–68	46–72	3–5	615–800	5
Горох / Peas	1400–11590	57–70	2,2	291	81–92	116–320	3,6–14,8	88–159	3
Огурцы / Cucumbers	144	?	54	-	65–77	?	3,2–3,7	92	2
Овес / Oat	29–36	30–66	16–25	0,07	18–22	7–10	2,4–3,1	239–337	5
Пшеница / Wheat	?	?	?	?	46–47	-	-	-	1
Рожь / Rye	?	46–77	63–71	-	45	33–45	2,3–2,8	?	2
Хлорелла / Chlorella	218	290	301	-	250	212	13	13	4

* Статистически недостоверные результаты. / * Statistically unreliable results.

тели на космодромах и аэродромах: ацетон, бензин, дизельное топливо, мазут и четыреххлористый углерод.

В связи с высокой летучестью и токсичностью диметилгидразина большую часть экспериментов проводили на продукте его первичного разложения в почве и воде – формалине. Это было также методически правильным, т.к. в окружающей среде диметилгидразин из-за своей химической активности и высокой нестабильности быстро разлагается на ряд продуктов окисления, одним из которых является формалин. Результаты биотестирования на тест-животных представлены в табл. 1.

Результаты оценки фитотоксичности почвы на различных семенах растений представлены в табл. 2.

Таким образом, по результатам предварительных лабораторных исследований, для биотестирования воды и почвы, загрязненных этой группой химических соединений, показали высокую чувствительность и избирательность дафнии и

дождевые черви; люминесцирующие микроорганизмы на приборе «Биотокс-10М»; хлорелла; из семян растений – редис и овес. Эти тест-объекты являются наиболее предпочтительными для проведения лабораторных исследований при мониторинге загрязненности территорий космодромов и аэропортов.

2. Изучение токсичности почвы и воды на территории аэропортов методами биотестирования

Изучение токсичности проб почвы и воды, отобранных на территориях аэропортов и космодрома, проводили с использованием различных животных-биотестов, растений, хлореллы, на приборе «Биотокс-10М», изучали ферментативную активность почвы, проводили химический анализ на содержание этиленгликоля, авиационного керосина, гептила. Результаты исследований представлены в сводных таблицах 3–13.

Таблица 3. Анализ проб воды из аэропорта АО «Домодедово» / Table 3. Analysis of water samples from Domodedovo airport

Место отбора / Sampling location	Химический анализ / Chemical analysis		Биотокс. индекс токсичности в % (M ± σ), токсичность / Biotox. toxicity index in %, (M + σ), toxicity	Дафнии / Daphnia	Рыбы гуппи/Данио Guppy fish/Danio	Содержание микрофлоры, КОЕ/мл / Microflora content, CFU/ml	Хлорелла / Chlorella
	Содержание этиленгликоля, мг/л воды / Ethylene glycol content, mg/l water	Содержание нефтепродуктов, мг/л воды / Oil content, mg/l water					
Сток 1, ЭД-40 П1 / Drain 1, ED-40 P1	0,04	27,3	26,1 ± 1,8, слабо токсично / slightly toxic	100%, токсично / toxic	0 / 0, не токсично / non-toxic	1,3 × 10 ⁶	40,6, токсично / toxic
Сток 1, ЭД-43 Д1 / Drain 1, ED-43 D1	0,9	5,9	42,7 ± 0,6, токсично / toxic	100%, токсично / toxic	0 / 0, не токсично / non-toxic	3,8 × 10 ⁵	41,1, токсично / toxic
Сток 5, ЭД-41 Д5 / Drain 5, ED-41 D5	0,08	24,6	43,1 ± 2,4, токсично / toxic	84%, токсично / toxic	0 / 0, не токсично / non-toxic	2,8 × 10 ⁴	42,3, токсично / toxic
Сток 5, ЭД-42 П5 / Drain 5, ED-42 P5	0,03	46,9	31,5 ± 1,0, токсично / toxic	84%, токсично / toxic	0 / 0, не токсично / non-toxic	5,2 × 10 ⁴	36,6, токсично / toxic
Дер. Кутузово, река Гнилуша / Kutuzovo village, Gnilusha river	0,30	0,476	31,9 ± 1,8, токсично / toxic	80%, токсично / toxic	0 / 0, не токсично / non-toxic	3,1 × 10 ⁴	36,00, токсично / toxic
Южнее аэропорта, водоем Журавлиная заводь / South of the airport, the pond Crane creek	0,11	1,70	72,7 ± 0,4, сильно токсично / highly toxic	80%, токсично / toxic	0 / 0, не токсично / non-toxic	1,9 × 10 ⁵	53,3, сильно токсично / highly toxic

Таблица 4. Анализ проб почвы из аэропорта АО «Домодедово» / Table 4. Analysis of soil samples from Domodedovo airport

Место отбора / Sampling location	Химический анализ / Chemical analysis		Биотокс. индекс токсичности в % (M ± σ), токсичность / Biotox. toxicity index in %, (M + σ), toxicity	Дафнии / Daphnia	Содержание микрофлоры, КОЕ/г / Microflora content, CFU/g	Фитотоксичность / Phytotoxicity
	Содержание этиленгликоля, мг/кг почвы / Ethylene glycol level, mg/l of water	Содержание нефтепродуктов, мг/кг почвы / Level of petroleum products, mg/l of water				
Сток 1, ЭД-39 Д1 / Drain 1, ED-39 D1	0,09	1,39	47,8 ± 2,5, токсично / toxic	20%, не токсично / non-toxic	1,1 × 10	51,1 / 46,4
Сток 1, ЭД-40 П1 / Drain 1, ED-40 P1	0,06	1,95	22,8 ± 1,3, не токсично / non-toxic	0%, не токсично / non-toxic	1,9 × 10 ⁷	24,7 / 24,2
Сток 5, ЭД-42 П5 / Drain 5, ED-42 P5	0,09	0,31	20,0 ± 0,9, слабо токсично / mildly toxic	0%, не токсично / non-toxic	2,1 × 10 ⁷	6,4 / 24,2
Сток 5, ЭД-47 Д5 / Drain 5, ED-47 D5	0,09	0,60	56,7 ± 1,8, сильно токсично / highly toxic	20%, не токсично / non-toxic	1,9 × 10 ⁴	14,2 / 37,3
Территория аэропорта / Airport territory	0,06	0,27	23,6 ± 0,4, токсично / toxic	0, не токсично / non-toxic	4,2 × 10 ⁶	0,63 / 15,7
Южнее аэропорта, берег водоема Журавлиная заводь / South of the airport, the shore of the reservoir Crane creek	1,32	0,42	56,5 ± 0,6, токсично / toxic	60, токсично / toxic	5,1 × 10 ⁵	0,52 / 14,1

Таблица 8. Ферментативная активность образцов почвы с прилегающей территории к аэропорту АО «Шереметьево»
Table. 8. Enzymatic activity of soil samples from the adjacent territory to the airport of Sheremetyevo JSC

Место отбора / Sampling location	Дегидрогеназная активность, мг ТФФ /10 г / Dehydrogenase activity mg TFF /10 g	Гидролазная активность почвы, мг ФДА Г ⁻¹ ч ⁻¹ / Hydrolyase activity of the soil, mg FDA g ⁻¹ h ⁻¹	Интенсивность разложения целлюлозы в почве, % / The intensity of cellulose decomposition in soil, %
Водовыпуск южный / Southern water outlet	19,2 ± 1,0	28,6 ± 0,7	0,0
Водовыпуск южный / Southern water outlet	14,2 ± 0,4	15,1 ± 0,4	20,3 ± 0,6
Почва чистая (контроль) / Clean soil (control)	32,4 ± 0,8	35,2 ± 1,0	20,1 ± 1,1
			29,7 ± 0,6
			30 суток / 30 days
			44,4 ± 1,3
			39,3 ± 1,1
			68,8 ± 2,0

Таблица 9. Анализ воды на территории аэропорта Салехарда
Table. 9. Water analysis on the territory of Salekhard airport

Место отбора / Sampling location	Химический анализ / Chemical analysis	Биотокс, индекс токсичности в % (M ± σ), токсичность / Biotox, toxicity index in %, toxicity	Дарфнии, острый опыт, гибель в %, токсичность / Daphnia, Acute experience, mortality in %, toxicity	Численность аборигенной микрофлоры, КОЕ/мл / Number of native microflora, CFU/ml*	Хлорелла / Chlorocella
Сток 1, до биофильтров / Drain 1, before biofilters	Содержание этиленгликоля, мг/л воды / Ethylene glycol content, mg/l of water	0,73	60*	1,3 × 10 ³	Острый опыт, отклонение от контроля, % / Experience, deviation from control, %, toxicity
Сток 2, до биофильтров / Drain 2, before biofilters	Содержание нефтепродуктов, мг/дм ³ / Content of petroleum products, mg/dm ³	0,80	60*	9,7 × 10 ³	Хронический опыт, отклонение от контроля, % / Chronic experience, deviation from control, %, toxicity
Сток 3, до биофильтров / Drain 3, before biofilters	Содержание нефтепродуктов, г/кг почвы / The content of petroleum products, g/kg of soil	0,71	60*	1,4 × 10 ⁴	Острый опыт, отклонение от контроля, % / Experience, deviation from control, %, toxicity

* усредненная проба из 3 стоков из-за малого количества воды.
* average sample from 3 drains due to small amount of water.

Таблица 10. Анализ проб почвы на территории аэропорта АО «Салехард»
Table. 10. Analysis of soil samples on the territory of the airport JSC "Salekhard"

Место отбора / Sampling location	Химический анализ / Chemical analysis	Биотокс, индекс токсичности в % (M ± σ), токсичность / Biotox, toxicity index in %, toxicity	Дарфнии, острый опыт, гибель в %, токсичность / Daphnia, Acute experience, death in %, toxicity	Содержание микрофлоры, КОЕ/г / Microflora content, CFU/g	Фитотоксичность / Phytotoxicity	Дождевые черви / Earthworms
Сток 1, до биофильтров / Drain 1, before biofilters	Содержание этиленгликоля, г/кг почвы / Ethylene glycol content, g/kg of soil	0,73	70, токсично / toxic	2,0 × 10 ³	Редис, индекс фитотоксичности по массе/по длине, % / Radish, Phytotoxicity Index by weight/length, %	Острый опыт, гибель в %, токсичность / Experience, death in %, toxicity
Сток 2, до биофильтров / Drain 2, before biofilters	Содержание нефтепродуктов, г/кг почвы / The content of petroleum products, g/kg of soil	0,80	60, токсично / toxic	1,3 × 10 ⁶	Овес, индекс фитотоксичности по массе / по длине, % / Oat, Phytotoxicity Index by weight / length, %	Хронический опыт, гибель в %, токсичность / Chronic experience, death in %, toxicity
Сток 3, до биофильтров / Drain 3, before biofilters	Содержание этиленгликоля, г/кг почвы / Ethylene glycol content, g/kg of soil	0,71	100, токсично / toxic	2,6 × 10 ⁶	55,1 / 54,8*	Острый опыт, гибель в %, токсичность / Experience, death in %, toxicity

* усредненная проба из 3 стоков из-за малого количества почвы.
* average sample from 3 drains due to small amount of water.

Таблица 11. Ферментативная активность почвы на территории аэропорта АО «Салехард»
Table. 11. Enzymatic activity of soil on the territory of the airport JSC "Salekhard"

Место отбора / Sampling location	Дегидрогеназная активность, мг ТДФ /10 г / Dehydrogenase activity mg TPP /10 g	1 сутки / 1 day	Гидролазная активность почвы, мг ФДА г ⁻¹ ч ⁻¹ / Soil hydrolase activity, mg FDA g ⁻¹ h ⁻¹	0 суток / 0 days	14 суток / 14 days	30 суток / 30 days	Интенсивность разложения целлюлозы в почве, % / Intensity of cellulose decomposition in the soil, %
Сток 1, до биофильтров / Drain 1, before biofilters	10,3 ± 0,3	8,3 ± 0,4	0,0	0,0	9,2 ± 0,6	24,8 ± 0,5	
Сток 2, до биофильтров / Drain 2, before biofilters	11,5 ± 0,5	9,8 ± 0,3	0,0	0,0	8,8 ± 0,3	19,6 ± 1,0	
Сток 3, до биофильтров / Drain 3, before biofilters	12,3 ± 0,5	13,3 ± 1,0	0,0	0,0	12,7 ± 0,9	28,7 ± 1,3	
Почва чистая (контроль) / Soil clean (control)	42,5 ± 1,2	40,1 ± 1,4	0,0	0,0	36,5 ± 1,0	81,4 ± 0,8	

Таблица 12. Анализ проб почвы с космодрома «Байконур»
Table. 12. Analysis of soil samples from the Baikonur cosmodrome

Место отбора / Sampling location	Содержание гептила, мг/кг почвы / Hepyl content, mg/kg of soil	Биотокс, индекс токсичности в % (M ± σ), токсичность / Biotox, toxicity index in %, toxicity (M + σ)	Дафнии острый опыт, гибель в %, токсичность / Daphnia Acute experience, death in %, toxicity	Содержание микрофлоры, КОЕ/г / Microflora content, CFU/g	Фитотоксичность / Phytotoxicity		Дождевые черви / Earthworms
					индекс фитотоксичности по массе / по длине, % / Radish Phytotoxicity index by weight/length, %	Овес, индекс фитотоксичности по массе / по длине, % / Oat Phytotoxicity index by weight / length, %	
Почва с космодрома / Soil from the cosmodrome	40	67,7 ± 1,5 высоко токсично / highly toxic	100, высоко токсично / highly toxic	(4,54 ± 0,11) × 10 ⁵	41,2 / 66,5	19,7 / 43,5	0, не токсично / non-toxic
Почва чистая (контроль) / Soil clean (control)	-	-	0, не токсично / non-toxic	(1,82 ± 0,22) × 10 ⁷	-	-	0, не токсично / non-toxic

Таблица 13. Ферментативная активность почвы с космодрома «Байконур»
Table. 13. Enzymatic activity of soil from the Baikonur cosmodrome

Место отбора / Sampling location	Дегидрогеназная активность, мг ТДФ /10 г / Dehydrogenase activity mg TPP /10 g	1 сутки / 1 day	Гидролазная активность почвы, мг ФДА г ⁻¹ ч ⁻¹ / Hydrolase activity of the soil, mg FDA g ⁻¹ h ⁻¹	0 суток / 0 days	14 суток / 14 days	30 суток / 30 days	Интенсивность разложения целлюлозы в почве, % / The intensity of cellulose decomposition in soil, %
Почва с космодрома / Soil from the cosmodrome	6,6 ± 0,3	4,2 ± 0,4	0,0	0,0	15,7 ± 0,7	28,6 ± 5,4	
Почва чистая (контроль) / The soil is clean (control)	40,3 ± 0,9	36,1 ± 0,8	0,0	0,0	44,1 ± 0,7	63,6 ± 4,8	

Биотестирование грунтовых вод из дренажной системы аэропортов АО «Домодедово» и АО «Шереметьево», а также прилегающих территорий выполнили на дафниях, рыбах гуппи, хлорелле. Провели химический анализ содержания этиленгликоля и нефтепродуктов, а также оценили содержание микрофлоры (табл. 3, 4).

Одним из основных методов изучения функциональной активности микробного сообщества почвы является оценка ферментативной активности почвы. Для этих целей используют триаду основополагающих ферментов почвы, показывающих скорость разложения белков, углеводов и целлюлозы (остатков стеблей растений). Это гидролазная, дегидрогеназная и целлюлазная активности ферментов почвы. Результаты исследований представлены в табл. 5.

Заключение

Проведена оценка острой и хронической токсичности проб воды и почвы, отобранных с территорий аэропортов АО «Домодедово» и АО «Шереметьево» (Моск-ва), АО «Салехард», с космодрома «Байконур» (Казахстан). Тестирование проводили на лабораторных линиях дафний, рыб гуппи и данио-рерио, дождевых червей, на семенах однодольных (овес) и двудольных растений (редис), клетках водорослей хлореллы, на приборе «Биотокс-10М» с люминесцентным микробным препаратом «ЭкоЛюм». Также изучали ферментативную активность почвы (гидролазную, дегидрогеназную и целлюлазную), численность аборигенных микроорганизмов.

Биотестирование образцов с территорий аэропортов и прилегающей зоны показало, что загрязнения воды и почвы этиленгликолем и авиационным керосином близки к допустимым значениям и не представляют угрозы здоровью пассажиров и обслуживающего персонала.

Биотестирование почвы на территории космодрома с места падения «Протон-М», платформа 81, показало высокую остаточную токсичность для биотестов, фитотоксичность, значительное угнетение почвенной микрофлоры, снижение ферментативной активности. Длительное нахождение на загрязненной гептилом территории без защитной одежды и фильтрующих респираторов представляет опасность для здоровья людей.

Результаты лабораторных исследований по биотестированию воды и почвы с территорий аэропортов и космодрома показали высокую чувствительность и избирательность следующих тест-объектов: дафнии, люминесцирующие микроорганизмы на приборе «Биотокс-10М», водоросль хлорелла, семена растений.

Высокочувствительными к загрязнению гептилом оказались показатель численности аборигенных микроорганизмов и ферментативная активность почв (гидролазная, дегидрогеназная). Эти тест-объекты являются также наиболее удобными для проведения исследований вследствие простоты культивирования в лабораторных условиях, удобства применения при мониторинге загрязненности территорий космодромов и аэропортов.

Биотестирование можно рекомендовать для оценки общей (интегральной) токсичности и загрязненности территорий аэропортов и космодромов, а также для экологического биомониторинга.

Информация о финансировании

Исследования выполнялись по государственному заказу Федерального медико-биологического агентства России №22.009.21.800.

Financial support

The studies were carried out under the state order of the Federal Medical and Biological Agency of Russia No 22.009.21.800.

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. Вредные химические вещества в ракетно-космической отрасли. Справочник (Под общей редакцией Уйба ВВ). ФМБЦ им. А.И.Бурназяна ФМБА России, 2011.
2. Кузнецов АЕ, Градова НБ. Научные основы эколобиотехнологии: Учеб. пособие для студентов. М.: Мир, 2006.
3. Кузнецов АЕ. Прикладная эколобиотехнология: Учеб. пособие. М.: Лаборатория знаний Бином. 2010;(1).
4. Соколов МС, Дядищев НР, Жариков ГА, Подгорный ЛИ. Концептуальное обоснование эколого-гигиенического нормирования экосистем. Токсикологический вестник. 2001;3:31-35.
5. ФР.1.39.2001.00283 «Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодovitости дафний». Акварос, 2001.
6. ПНД Ф Т 14.1:2:3.4.12-06/Т 16.1:2:2:2:3:3.9-06 (Издание 2021 г.) «Методика определения токсичности водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов, питьевой, сточной и природной воды по смертности тест-объекта *Daphnia magna* Straus». М., 2021.
7. Методические рекомендации «По применению методов биотестирования для оценки качества воды в системах хозяйственно-питьевого водоснабжения» МР № ЦОС ПВ 005-95. М., 1995.
8. Методическое руководство по биотестированию воды РД 118-02-09. М., 2009.
9. Стандарт ИСО 734. Лихачев СВ, Пименова ЕВ, Жакова СН. Биотестирование в экологическом мониторинге. Учебно-методическое пособие. Пермь: ИПЦ «Прокрость», 2020.
10. Фомин ГС, Фомин АГ. Почва. Контроль качества и экологической безопасности по международным стандартам. Справочник. М.: Протектор, 2001.
11. Стандарт ИСО 11268-1:1993 «Качество почвы. Воздействие загрязняющих веществ на земляных червей (*Eisenia fetida*). М., 2011.
12. Стандарт OECD #207 «Earthworm Acute Toxicity Test». 1984.
13. Стандарт EPA OPPTS 850.6200 «Earthworm Subchronic Toxicity Test». Public Draft. 1996.
14. Берестецкий ОА. Методы определения токсичности почвы. Микробиологические и биохимические исследования почв. Киев: Урожай, 1971.
15. ГОСТ Р ИСО 22030-2009 Биологические методы. Хроническая фитотоксичность в отношении высших растений. 2019.
16. ФР.1.39.2001.00284 Жмур НС, Орлова ТЛ. «Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей»: Федер. реестр ФР.1.39.2001.00284. М.: Акварос, 2001.

17. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04/ Т 16.1:2:2:2:3:3.7-04 (Издание 2021 г.) «Методика измерений оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, донных отложений, осадков сточных вод, отходов производства и потребления». М., 2021.
18. ГОСТ Р 54496–2011 (ISO 8692:2004) ВОДА. Определение токсичности с использованием зеленых пресноводных одноклеточных водорослей. М.: Стандартинформ, 2012.
19. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 Т 16.1:2:3:3.8-04 «Методика определения интегральной токсичности поверхностных, в том числе морских, грунтовых, питьевых, сточных вод водных экстрактов почв, отходов, осадков сточных вод по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой «Эколюм». М., 2010.
20. Методические рекомендации №01.019.07 «Определение интегральной токсичности почв с помощью биотеста "Эколюм"». М., 2011.
21. Якушев АВ, Бызова БА. Гидролазная активность как показатель состояния микробного сообщества вермикомпоста. Вестник Моск. ун-та. Сер. 17: Почвоведение. 2009;2:41-46.
22. Методы почвенной микробиологии и биохимии: учеб. пособие под ред. Звягинцева ДГ. М.: Изд-во МГУ, 1991.
23. Практикум по агрохимии: учеб. пособие. 2 изд., перераб. и доп., под ред. академика РАСХН Минеева ВГ. М.: Изд-во МГУ, 2001.
24. ПНД ФТ 16.1.17-10 «Методика выполнения измерений интенсивности потребления тест-субстратов микробными сообществами почв и почвоподобных объектов фотометрическим методом». М., 2011.
25. СанПиН 3.3686-21. Санитарные правила и нормы Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней.
11. Standart ISO 11268-1:1993 «Kachestvo pochvy. Vozdeistvie zagryaznyayushchikh veshchestv na zemlyanykh chervei (*Eisenia fetida*). М., 2011. (In Russian).
12. Standart OECD #207 «Earthworm Acute Toxicity Test». 1984. (In Russian).
13. Standart EPA OPPTS 850.6200 «Earthworm Subchronic Toxicity Test». Public Draft, 1996. (In Russian).
14. Berestetsky OA. Metody opredeleniya toksichnosti pochvy. Mikrobiologicheskie i biokhimicheskie issledovaniya pochv. Kiev: Urozhai. (In Russian).
15. GOST R ISO 22030-2009 Biologicheskie metody. Khronicheskaya fitotoksichnost' v otnoshenii vysshikh rastenii. 2019. (In Russian).
16. FR.1.39.2001.00284 Zhmur NS, Orlova TL. «Metodika opredeleniya toksichnosti vod, vodnykh vytyazhek iz pochv, osadkov stochnykh vod i otkhodov po izmeneniyu urovnya fluorestsentsii khlorofilla i chislennosti kletok vodoroslei»: Feder. reestr FR.1.39.2001.00284. М.: Akvaros, 2001. (In Russian).
17. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04/ Т 16.1:2:2:2:3:3.7-04 (Izdanie 2021 g.) «Metodika izmerenii opticheskoi plotnosti kul'tury vodorosli khlorella (*Chlorella vulgaris* Beijer) dlya opredeleniya toksichnosti pit'evykh, presnykh prirodnykh i stochnykh vod, vodnykh vytyazhek iz gruntov, pochv, donnykh otlozhenii, osadkov stochnykh vod, otkhodov proizvodstva i potrebleniya». М., 2021. (In Russian).
18. GOST R 54496–2011 (ISO 8692:2004) VODA. Opredelenie toksichnosti s ispol'zovaniem zelenykh presnovodnykh odnokletochnykh vodoroslei. М.: Standartinform, 2012. (In Russian).
19. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 Т 16.1:2:3:3.8-04 (izdanie 2010 g.) «Metodika opredeleniya integral'noi toksichnosti poverkhnostnykh, v tom chisle morskikh, gruntovykh, pit'evykh, stochnykh vod vodnykh ekstraktov pochv, otkhodov, osadkov stochnykh vod po izmeneniyu intensivnosti bakterial'noi biolyuminesentsii test-sistemoi «Ekolyum». М., 2010. (In Russian).
20. Metodicheskie rekomendatsii №01.019.07 «Opredelenie integral'noi toksichnosti pochv s pomoshch'yu biotesta "Ekolyum"». М., 2011. (In Russian).
21. Yakushev AV, Byzova BA. Gidrolaznaya aktivnost' kak pokazatel' sostoyaniya mikrobного soobshchestva vermikomposta. Vestnik Mosk. un-ta. Ser. 17: Pochvovedenie. 2009;2:41-46. (In Russian).
22. Metody pochvennoi mikrobiologii i biokhimii: Ucheb. posobie pod red. Zvyagintseva DG. М.: Izd-vo MGU, 1991. (In Russian).
23. Praktikum po agrokhimii: Ucheb. posobie. 2 izd., pererab. i dop., pod red. akademika RASKhN Mineeva VG. М.: Izd-vo MGU, 2001. (In Russian).
24. ПНД ФТ 16.1.17-10 «Metodika vypolneniya izmerenii intensivnosti potrebleniya test-substratov mikrobnyimi soobshchestvami pochv i pochvopodobnykh ob'ektov fotometricheskim metodom». М., 2011. (In Russian).
25. SanPIN 3.3686-21. Sanitarnye pravila i normy Sanitarno-epidemiologicheskie trebovaniya po profilaktike infektsionnykh boleznei. (In Russian).

References

1. Vrednye khimicheskie veshchestva v raketno-kosmicheskoi otrasli. Spravochnik (Pod obshchei redaktsiei Uiba VV). FMBTs im. A.I.Burnazyana FMBA Rossii, 2011. (In Russian).
2. Kuznetsov AE, Gradova NB. Nauchnye osnovy ekobiotekhnologii: Ucheb. posobie dlya studentov. М.: Mir, 2006. (In Russian).
3. Kuznetsov AE. Prikladnaya ekobiotekhnologiya: Ucheb. posobie. М.: Laboratoriya znaniy Binom, 2010;(1). (In Russian).
4. Sokolov MS, Dyadishchev NR, Zharikov GA, Podgorny LI. Kontseptual'noe obosnovanie ekologo-gigienicheskogo normirovaniya ekosistem. Toxicological Review (Toksikologicheskiy vestnik). 2001;3:31-35. (In Russian).
5. FR.1.39.2001.00283 «Metodika opredeleniya toksichnosti vody i vodnykh vytyazhek iz pochv, osadkov stochnykh vod, otkhodov po smertnosti i izmeneniyu plodovitosti dafnii». Akvaros, 2001. (In Russian).
6. ПНД ФТ 14.1:2:3:4.12-06/Т 16.1:2:2:2:3:3.9-06 (Izdanie 2021 goda) «Metodika opredeleniya toksichnosti vodnykh vytyazhek iz pochv, osadkov stochnykh vod i otkhodov, pit'evoi, stochnoi i prirodnoi vody po smertnosti test-ob'ekta *Daphnia magna* Straus». М., 2021. (In Russian).
7. Metodicheskie rekomendatsii «Po primeneniyu metodov biotestirovaniya dlya otsenki kachestva vody v sistemakh khozyaistvenno-pit'evogo vodosnabzheniya» MR № TsOS PV 005-95. М., 1995. (In Russian).
8. Metodicheskoe rukovodstvo po biotestirovaniyu vody RD 118–02–09. М., 2009. (In Russian).
9. Standart ISO 734. Likhachev SV, Pimenova EV, Zhakova SN. Biotestirovanie v ekologicheskom monitoringe. Uchebno-metodicheskoe posobie. Perm': IPTs "Prokrost", 2020. (In Russian).
10. Fomin GS, Fomin AG. Pochva. Kontrol' kachestva i ekologicheskoi bezopasnosti po mezhdunarodnym standartam. Spravochnik. М.: Protektor, 2001. (In Russian).
11. Marchenko Anatolii Ivanovich, kandidat biologicheskikh nauk, nachalnik laboratorii toksikologicheskikh metodov *in vitro* otдела ekologicheskoy biotekhnologii, Nauchno-issledovatel'skogo tsentra toksikologii i gigienicheskoy reglamentatsii biopreparatov – filial ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства
12. Krainova Olga Aleksandrovna, kandidat biologicheskikh nauk, starshiy nauchnyy sotrudnik otдела ekologicheskoy biotekhnologii Nauchno-issledovatel'skogo tsentra toksikologii i gigienicheskoy reglamentatsii biopreparatov – filial ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства

Информация о соавторах:

Марченко Анатолий Иванович, кандидат биологических наук, начальник лаборатории токсикологических методов *in vitro* отдела экологической биотехнологии, Научно-исследовательского центра токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов – филиал ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства

Крайнова Ольга Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела экологической биотехнологии Научно-исследовательского центра токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов – филиал ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства

Information about co-authors:

Anatoly I. Marchenko, PhD in Biological Sciences, Head of the Laboratory of *in vitro* Toxicological Methods of the Department of Ecological Biotechnology, Research Center for Toxicology and Hygienic Regulation of Biological Products – branch of the State Research Center «Institute of Immunology» of the Federal Medical and Biological Agency

Olga A. Krainova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of the Department of Ecological Biotechnology, Research Center for Toxicology and Hygienic Regulation of Biological Products – branch of the State Research Center «Institute of Immunology» of the Federal Medical and Biological Agency

Стерилизация препаратов бактериальных теней *Yersinia pestis*

Е.М.Мазурина, Е.А.Бурмистров, Н.Ю.Буданова, А.С.Вагайская, А.С.Трунякова, Т.И.Комбарова, С.А.Иванов, И.А.Дунайцев, С.В.Дентовская, А.П.Анисимов

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

Бактериальные тени (БТ) – это клеточные оболочки, полученные из грамотрицательных бактерий, лишенные всего цитоплазматического содержимого, но имеющие сохраненную клеточную морфологию, включая все структуры клеточной поверхности. При использовании в качестве средств доставки субъединичных или ДНК-вакцин структура частиц и свойства поверхности БТ нацеливают сам носитель на первичные антигенпрезентирующие клетки. Кроме того, БТ проявляют присущие им адъювантные свойства и запускают усиленный гуморальный и клеточный иммунный ответ на антиген-мишень. При масштабировании процесса производства БТ, используемых в качестве компонента кандидатной инактивированной чумной вакцины, необходимо обеспечить полное отсутствие живых клеток аттенуированного штамма *Yersinia pestis* KM 260(12) Δ lpxM/pEYR-E-Y-K в препарате. В процессе стерилизации использовали стрептомицин или мертиолят натрия. Стрептомицин-содержащий препарат обладал выраженной токсичностью в отношении морских свинок, часть которых погибла после иммунизации. Вариант кандидатной вакцины, стерилизованный мертиолятом натрия, не вызывал гибели животных, они стабильно набирали вес после иммунизации, а индекс иммунитета составил $1,1 \cdot 10^5$.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, чума, вакцина, стерилизация, токсичность антибиотиков, стрептомицин, мертиолят натрия, морская свинка

Для цитирования: Мазурина Е.М., Бурмистров Е.А., Буданова Н.Ю., Вагайская А.С., Трунякова А.С., Комбарова Т.И., Иванов С.А., Дунайцев И.А., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Стерилизация препаратов бактериальных теней *Yersinia pestis*. Бактериология. 2023; 8(3): 36–40. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-36-40

Sterilization of *Yersinia pestis* bacterial ghost preparations

Е.М.Mazurina, Е.А.Burmistrov, N.Yu.Budanova, A.S.Vagaiskaya, A.S.Trunyakova, T.I.Kombarova, S.A.Ivanov, I.A.Dunaytsev, S.V.Dentovskaya, A.P.Anisimov

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

BGs are cell envelopes derived from Gram-negative bacteria, devoid of all cytoplasmic contents, but having preserved cellular morphology, including all structures of the cell surface. Using BGs as delivery vehicles for subunit or DNA vaccines, BGs are targeting the carrier itself to primary antigen-presenting cells. In addition, BG exhibit their inherent adjuvant properties and trigger an enhanced humoral and cellular immune response to the target antigen. When scaling up the production process of bacterial ghosts used as a component of a candidate inactivated plague vaccine, it is necessary to ensure the complete absence of living cells of the attenuated strain of *Yersinia pestis* KM260(12) Δ lpxM/pEYR-E-Y-K in the preparation. In the process of sterilization streptomycin or sodium merthiolate were used. The streptomycin-containing preparation was severely toxic to guinea pigs, some of which died after immunization. The variant of the candidate vaccine, sterilized with thimerosal, did not cause death in the animals; they steadily gained weight after immunization, and the immunity index was $1.1 \cdot 10^5$.

Key words: *Yersinia pestis*, plague, vaccine, sterilization, antibiotic toxicity, streptomycin, thimerosal, guinea pig

For citation: Mazurina E.M., Burmistrov E.A., Budanova N.Yu., Vagaiskaya A.S., Trunyakova A.S., Kombarova T.I., Ivanov S.A., Dunaytsev I.A., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. Sterilization of *Yersinia pestis* bacterial ghost preparations. Bacteriology. 2023; 8(3): 36–40. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-36-40

Для корреспонденции:

Мазурина Елизавета Михайловна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0117

Статья поступила 01.08.2023, принята к печати 29.09.2023

For correspondence:

Elizaveta M. Mazurina, Junior Researcher of laboratory for plague microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

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

The article was received 01.08.2023, accepted for publication 29.09.2023

Одними из первых препаратов, разработанных для иммунопрофилактики инфекционных заболеваний бактериальной природы, были инактивированные вакцины [1]. Обязательным этапом получения не способных вызвать инфекционное заболевание инактивированных (убитых) вакцин является полное обезвреживание бактерий с максимальным сохранением их иммуногенных свойств. Однако инаktivация бактерий с помощью физических или химических воздействий ведет к в той или иной степени разрушения бактериальных клеток и денатурации бактериальных белков, сопровождающихся, как правило, снижением иммуногенности или даже полной утратой антигенности. Так, снижают или полностью утрачивают свою антигенность белки, коагулированные кипячением, обработкой крепкими растворами кислот или щелочей [2–5]. Для решения этой проблемы в конце прошлого века была предложена технология «бактериальных теней (призраков)». Бактериальные тени (БТ) – это пустые оболочки клеток грамотрицательных бактерий, лишённые цитоплазматического содержимого, но сохраняющие неизменными все морфологические и структурные особенности клеточной поверхности их живых предшественников. БТ образуются в результате лизиса грамотрицательных бактерий, опосредованного белком E фага ϕ X174. Эндогенная экспрессия гена E приводит к образованию туннельной структуры через внутреннюю и внешнюю бактериальные мембраны. Высокое осмотическое давление внутри клетки ведет к вытеснению цитоплазматического содержимого в окружающую среду, что приводит к образованию бактериальных призраков [6].

Экспрессия белка E не обязательно убивает все бактерии, но один из критериев качества бактериальнотеневых вакцин предусматривает в препарате, прошедшем индукцию синтеза белка E, отсутствие перед лиофилизацией живых бактериальных клеток. Оставшиеся живые бактерии должны быть инактивированы [7]. Введение в геном продуцентов бактериальных призраков генов дополнительных систем фагового лизиса, состоящих из холина, эндолизина и спанинов, вело к дальнейшему снижению числа жизнеспособных клеток [8]. Совместно с литическими белками часто используют неспецифическую нуклеазу из *Staphylococcus aureus*, которая гидролизует нуклеиновые кислоты, что одновременно убивает не подвергшиеся лизису бактериальные клетки, предотвращает перенос генетического материала патогена и снижает вязкость препарата теней [9]. И, наконец, для снижения числа живых бактерий также используют бактерицидные антибиотики [10] и β -пропиолактон [7].

Ранее в лабораторных условиях мы получили препараты БТ чумного микроба [11] для создания кандидатной чумной трехкомпонентной вакцины.

Цель настоящей работы состояла в подборе оптимального метода стерилизации на этапе масштабирования процесса наработки кандидатной чумной трехкомпонентной вакцины, состоящей из препарата БТ аттенуированного штамма *Yersinia pestis* KM 260(12) Δ lpxM/pEYR-E-Y-K и иммунодоминантных антигенов чумного микроба – капсульного антигена F1 (Caf1) и V антигена (LcrV).

Материалы и методы

Штаммы бактерий. Для получения БТ, антигенов V и F1 использовали штаммы-продуценты *Y. pestis* KM260(12)

Δ lpxM/pEYR'-E-Y-K, *Escherichia coli* BL21/pETV-I-3455 и *Yersinia pseudotuberculosis* 11M/pPKB-F1 соответственно.

Лабораторные животные. С полученными из филиала «Апрелевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России морскими свинками весом 275 ± 25 г обращались в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными». Протоколы экспериментов с животными одобрены комитетом по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ (ВП-2021/4).

Биохимические методы. LcrV выделяли из бульонной культуры штамма *E. coli* BL21/pETV-I-3455 и очищали с последовательным использованием гель-фильтрации, анионообменной хроматографии (DEAE TSK 650M) и гидрофобной хроматографии [12].

Секретируемый капсульный антиген выделяли из надосадочной фракции бульонной культуры штамма *Y. pseudotuberculosis* 11M/pFSK 3/9 путем ее фракционирования сульфатом аммония с последующей хроматографической очисткой (MP 4.2.0219 – 20 «Выделение и очистка F1 антигена чумного микроба»).

Препаративное получение бактериальных теней. БТ штамма *Y. pestis* KM260(12) Δ lpxM/pEYR'-E-Y-K получали методом глубокого культивирования в ферментере с рабочим объемом 10 л в жидкой обогащенной питательной среде при уровне аэрации и перемешивания для обеспечения массообмена не ниже 20% от насыщения по O₂. При достижении бактериальной культурой оптической плотности (ОП) $\geq 2,0$ ед. запускали лизис клеток путем подъема температуры до 42,0°C. После завершения лизиса культуру биомассу отделяли путем центрифугирования при 11 000 г в течение 15 мин. Стерильности препарата БТ достигали двумя способами. В первом из них биомассу выдерживали в водном растворе стрептомицина (100 мкг/мл) в течение 10 мин [10] с последующей трехкратной отмывкой холодной (4°C) дистиллированной водой. Во втором после трехкратной отмывки холодной (4°C) дистиллированной водой сырую биомассу ресуспендировали в дистиллированной воде с добавлением мертиолята натрия (0,2 мг/л) и инкубировали 16 ч при температуре 2–8°C. Контроль стерильности проводили методом прямого посева по ГФ XII, часть 1, стр. 125.

Смешивание препарата ВЧТК и лиофилизация

К водной суспензии БТ добавляли фосфатный буфер, поливинилпирролидон (25 000 кДа), рекомбинантные F1 и V антигены чумного микроба. Конечная концентрация БТ составляла 10¹² м.к./л, фосфатного буфера 10 г/л, поливинилпирролидона 10 г/л, антигена F1 100 мг/л, V антигена 100 мг/л. Суспензию разливали по 1 мл во флаконы. Лиофилизацию проводили в сушилке VirTis (США) при остаточном давлении 80 мТор и температуре конденсатора -70°C в течение 24 ч. Остаточная влажность не превышала 5%.

Определение присутствия антибиотиков. Для определения наличия остаточных количеств стрептомицина высушенный препарат БТ ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды и инкубировали 24 ч при температуре 8°C. После осаждения БТ путем центрифугирования электрофоретическое определение антибиотика в супернатанте проводили с использованием системы высокоэффективного капиллярного электрофореза «Капель-105М» («Люмэкс»,

Россия) со спектрофотометрическим детектором в кварцевом капилляре с внешним полиимидным покрытием при использовании термостатирования капилляра.

Иммунологические методы. Для оценки титров антител к рекомбинантным белкам и препарату БТ *Y. pestis* в сыворотках иммунных морских свинок использовали метод твердофазного иммуоферментного анализа [13].

Напряженность иммунитета, т.е. способность вакцинального препарата предохранять животное от гибели при заражении массивными дозами вирулентной культуры, определяли по формуле:

$$ИИ = ЛД_{50Имм} / ЛД_{50Инт},$$

где $ЛД_{50}$ – средняя летальная доза; $ЛД_{50Имм}$ – это $ЛД_{50}$ для животных, иммунизированных исследуемым антигеном; $ЛД_{50Инт}$ – это $ЛД_{50}$ для интактных (неиммунизированных) животных.

Морских свинок иммунизировали подкожно двукратно с интервалом в 2 нед. в область верхней трети правого бедра тестируемым кандидатным препаратом (F1 – 10 мкг, V – 10 мкг, БТ – $2 \cdot 10^8$ м.к.) в объеме 0,5 мл. В качестве отрицательного контроля (плацебо) использовали группу животных, получивших только раствор PBS. На 30-е сутки после первой иммунизации животных заражали подкожно серийными 10-кратными разведениями двухдневной агаровой культуры штамма *Y. pestis* 231 дикого типа, выращенной при температуре 28°C (три животных на дозу). Наблюдение за зараженными животными продолжали в течение 21 суток. Погибших животных вскрывали и исследовали бактериологическим методом.

Статистические методы. Статистический анализ проводили, используя Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, США). $ЛД_{50}$ и 95%-е доверительные интервалы вирулентного штамма для иммунизированных и неиммунизированных животных рассчитывали с использованием метода Кербера [14].

Результаты исследования и их обсуждение

Общую реакцию организма морских свинок на введение препаратов стрептомицина и мертиолята натрия оценивали по изменению веса животных, внешнему виду (состояние шерсти, слизистых оболочек носа и глаз), поведению животных (двигательная активность, поедание корма). На протяжении двух иммунизаций ежедневно производили измерение веса животных во всех экспериментальных и в контрольной группе. Согласно полученным результатам, в группах животных, получивших препараты с мертиолятом натрия или PBS, отмечали увеличение веса начиная с первых суток после введения вплоть до момента их заражения. На протяжении всего времени эксперимента животные не теряли интерес к корму, были активны и имели удовлетворительный внешний вид. При ежедневном ветеринарном осмотре после вакцинации не были выявлены никакие местные воспалительные реакции (отек, гиперемия, некроз и т.д.) в месте введения препаратов. Все это свидетельствует об отсутствии токсичности для организма экспериментальных животных.

У двух морских свинок после иммунизации препаратом ВЧТК, содержащим БТ, стерилизованные стрептомицином, отмечали снижение массы тела, возникшее на 10–11-е сутки

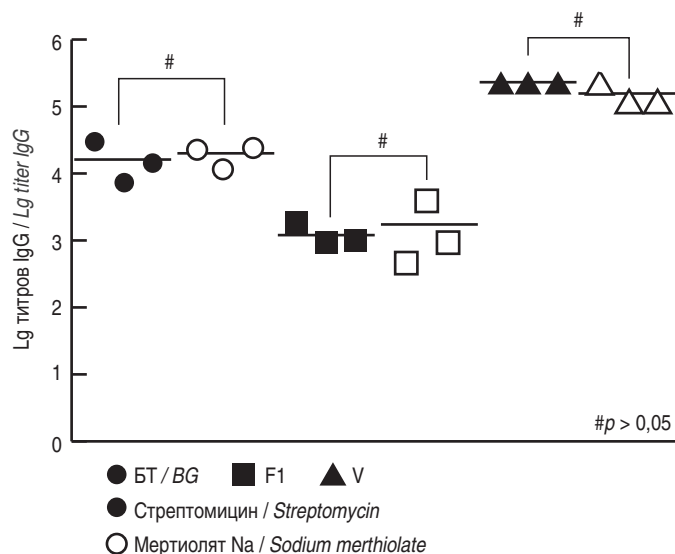


Рисунок. Средние реципрокные титры IgG после иммунизации прототипами чумной трехкомпонентной вакцины.
 Figure. Average reciprocal IgG titers after immunization with three-component plague vaccine prototypes.

после первой иммунизации и прогрессирующее после второй иммунизации вплоть до гибели на 5-е и 12-е сутки. У павших животных отмечали истощение – падение веса до 130 г в течение 2 нед., кровотечение из мочеиспускательного канала, паралич задних конечностей. При патологоанатомическом осмотре – некроз почек, увеличение надпочечников, вздутие кишечника. Остальные свинки данной группы имели удовлетворительный внешний вид и набирали вес до момента заражения.

Подкожное введение обоих препаратов ВЧТК стимулировало продукцию антител у лабораторных животных. Отмечали увеличение титров специфических IgG-антител к БТ, F1 и V антигенам после второй иммунизации у морских свинок (рисунок). Отличия между группами, иммунизированными препаратами, стерилизованными стрептомицином или мертиолятом натрия, были не достоверны ($p > 0,05$).

При определении напряженности иммунитета, индуцированного введением препаратов ВЧТК, неиммунные морские свинки контрольной группы, зараженные *Y. pestis* 231, пали к 10-м суткам наблюдения. Величина $ЛД_{50}$ вирулентного штамма *Y. pestis* 231 для морских свинок, иммунизированных препаратами ВЧТК (таблица), достоверно отличалась от $ЛД_{50}$ для контрольной группы животных ($p < 0,001$). Индекс иммунитета для препарата после обработки мертиолятом натрия на три порядка превосходил аналогичный показатель для препарата после стерилизации стрептомицином.

Таблица. Иммунологическая активность препаратов Table. Immunological activity of preparations		
Препарат / Preparation	$ЛД_{50}$ <i>Y. pestis</i> 231, КОЕ / LD_{50} <i>Y. pestis</i> 231, CFU	Индекс иммунитета / Immunity Index
ВЧТК / three-component plague vaccine	Мертиолят Na / Sodium merthiolate	$>3,2 \cdot 10^5$
	Стрептомицин / Streptomycin	$6,8 \cdot 10^2$ (171–2712)
PBS	3 (1–13)	1

Было высказано предположение о неэффективности отмывки препарата БТ от стрептомицина. Определение наличия в препаратах антибиотика проводили с помощью капиллярного электрофореза, который применяют для решения разных аналитических задач благодаря высокой эффективности разделения, воспроизводимости метода, низкому расходу реагентов, возможности быстро регенерировать капилляр в случае анализа объектов со сложной, например биологической, матрицей. Количественное определение стрептомицина выполняли методом добавок. Содержание стрептомицина после отмывки дистиллированной водой и лиофилизации составило 146 мкг/флакон (14,6 мкг/животное).

Принято считать, что основным механизмом токсичности антибиотиков у грызунов являются вторичные эффекты нарушения нормальной кишечной флоры. У морских свинок специфической причиной смерти часто являются токсины TcdA и TcdB, продуцируемые размножившимися на фоне дисбактериоза бактериями *Clostridium difficile*. Введение морским свинкам ауреомицина вело к бурному росту бактерий *Listeria monocytogenes*, а затем к септицемии и некротическим поражениям органов [15].

С учетом этих данных логично предположить, что и в наших экспериментах гибель животных была связана с присутствием в кандидатной вакцине следовых количеств стрептомицина, использованного для уничтожения потенциально оставшихся жизнеспособными бактерий.

Замена стрептомицина на мертиолят натрия (этил ртути), который входит в состав многих вакцин в качестве консерванта, либо как стерилизующий агент на отдельных стадиях технологического процесса, либо как стабилизатор антигенов в процессе очистки [16], сопровождалась исчезновением токсичности препарата ВЧТК. Новый вариант кандидатной вакцины не вызывал гибели животных, они стабильно набирали вес после иммунизации, а индекс иммунитета составил $1,1 \cdot 10^5$.

Информация о финансировании

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение №075-15-2019-1671 от 31.10.2019).

Financial support

The work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No 075-15-2019-1671 dated 10/31/2019).

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. Plotkin SA, Plotkin SL. The development of vaccines: how the past led to the future. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(12):889-93. DOI: 10.1038/nrmicro2668
2. Bogahawaththa D, Chandrapala J, Vasiljevic T. Thermal denaturation of bovine β -lactoglobulin in different protein mixtures in relation to antigenicity. *International Dairy Journal.* 2019;91:89-97.

3. Kriegshäuser G, Kuechler E, Skern T. Aggregation-associated loss of antigenicity observed for denatured virion protein 1 of Equine rhinitis A virus in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Virus Res.* 2009;143(1):130-3. DOI: 10.1016/j.virusres.2009.03.003
4. Sassi ML, Eriksen H, Risteli L, Niemi S, Mansell J, Gowen M, et al. Immunochemical characterization of assay for carboxyterminal telopeptide of human type I collagen: loss of antigenicity by treatment with cathepsin K. *Bone.* 2000;26(4):367-73. DOI: 10.1016/S8756-3282(00)00235-0
5. Johnson LR, Wormall A. The immunological properties of alkali-treated proteins. *Biochem J.* 1932;26(4):1202-13. DOI: 10.1042/bj0261202
6. Doan D, Thanh T, Xuan H. Study of chemical-based induced bacterial ghost applied in vaccine production. *Engineering & Technology.* 2020;10(1):17-28.
7. Langemann T, Koller VJ, Muhammad A, Kudela P, Mayr UB, Lubitz W. The Bacterial Ghost platform system: production and applications. *Bioeng Bugs.* 2010;1(5):326-36. DOI: 10.4161/bbug.1.5.12540
8. Won G, Hajam IA, Lee JH. Improved lysis efficiency and immunogenicity of *Salmonella* ghosts mediated by co-expression of λ phage holin-endolysin and ϕ X174 gene E. *Sci Rep.* 2017;7:45139. DOI: 10.1038/srep45139
9. Fu L, Lu C. A novel dual vector coexpressing Φ X174 lysis E gene and staphylococcal nuclease A gene on the basis of lambda promoter pR and pL, respectively. *Mol Biotechnol.* 2013;54(2):436-44. DOI: 10.1007/s12033-012-9581-0
10. Cai K, Zhang Y, Yang B, Chen S. *Yersinia enterocolitica* ghost with msbB mutation provides protection and reduces proinflammatory cytokines in mice. *Vaccine.* 2013;31(2):334-40. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.11.004
11. Dentovskaya SV, Vagaikaya AS, Platonov ME, Trunyakova AS, Kotov SA, Krasil'nikova EA, et al. Peptidoglycan-free bacterial ghosts confer enhanced protection against *Yersinia pestis* infection. *Vaccines (Basel).* 2021;10(1):51. DOI: 10.3390/vaccines10010051
12. Копылов ПХ, Светоч ТЭ, Иванов СА, Комбарова ТИ, Перовская ОН, Титарева ГМ, и др. Особенности хроматографической очистки и протективности изоформ LcrV *Yersinia pestis*. Прикладная биохимия и микробиология. 2019;55(5):471-480. DOI: 10.1134/S0555109919040081
13. Егоров АМ, Осипов АП, Дзантиев ББ, Гаврилова ЕМ. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высш. шк., 1991.
14. Finney DJ. Statistical method in biological assay. Charles Griffin & Company, 1978.
15. Morris TH. Antibiotic therapeutics in laboratory animals. *Lab Anim.* 1995;29(1):16-36. DOI: 10.1258/002367795780740393
16. Dórea JG. Low-dose Thimerosal (ethyl-mercury) is still used in infants' vaccines: Should we be concerned with this form of exposure? *J Trace Elem Med Biol.* 2018;49:134-139. DOI: 10.1016/j.jtemb.2018.05.010

References

1. Plotkin SA, Plotkin SL. The development of vaccines: how the past led to the future. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(12):889-93. DOI: 10.1038/nrmicro2668
2. Bogahawaththa D, Chandrapala J, Vasiljevic T. Thermal denaturation of bovine β -lactoglobulin in different protein mixtures in relation to antigenicity. *International Dairy Journal.* 2019;91:89-97.
3. Kriegshäuser G, Kuechler E, Skern T. Aggregation-associated loss of antigenicity observed for denatured virion protein 1 of Equine rhinitis A virus in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Virus Res.* 2009;143(1):130-3. DOI: 10.1016/j.virusres.2009.03.003
4. Sassi ML, Eriksen H, Risteli L, Niemi S, Mansell J, Gowen M, et al. Immunochemical characterization of assay for carboxyterminal telopeptide of human type I collagen: loss of antigenicity by treatment with cathepsin K. *Bone.* 2000;26(4):367-73. DOI: 10.1016/S8756-3282(00)00235-0
5. Johnson LR, Wormall A. The immunological properties of alkali-treated proteins. *Biochem J.* 1932;26(4):1202-13. DOI: 10.1042/bj0261202

- Doan D, Thanh T, Xuan H. Study of chemical-based induced bacterial ghost applied in vaccine production. *Engineering & Technology*. 2020;10(1):17-28.
- Langemann T, Koller VJ, Muhammad A, Kudela P, Mayr UB, Lubitz W. The Bacterial Ghost platform system: production and applications. *Bioeng Bugs*. 2010;1(5):326-36. DOI: 10.4161/bbug.1.5.12540
- Won G, Hajam IA, Lee JH. Improved lysis efficiency and immunogenicity of *Salmonella* ghosts mediated by co-expression of λ phage holin-endolysin and ϕ X174 gene E. *Sci Rep*. 2017;7:45139. DOI: 10.1038/srep45139
- Fu L, Lu C. A novel dual vector coexpressing ϕ X174 lysis E gene and staphylococcal nuclease A gene on the basis of lambda promoter pR and pL, respectively. *Mol Biotechnol*. 2013;54(2):436-44. DOI: 10.1007/s12033-012-9581-0
- Cai K, Zhang Y, Yang B, Chen S. *Yersinia enterocolitica* ghost with msbB mutation provides protection and reduces proinflammatory cytokines in mice. *Vaccine*. 2013;31(2):334-40. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.11.004
- Dentovskaya SV, Vagaiskaya AS, Platonov ME, Trunyakova AS, Kotov SA, Krasil'nikova EA, et al. Peptidoglycan-free bacterial ghosts confer enhanced protection against *Yersinia pestis* infection. *Vaccines (Basel)*. 2021;10(1):51. DOI: 10.3390/vaccines10010051
- Kopylov PK, Svetoch TE, Ivanov SA, Kombarova TI, Perovskaya ON, Titareva GM, et al. Characteristics of the chromatographic cleaning and protectiveness of the LcrV isoform of *Yersinia pestis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2019;55(5):471-480. DOI: 10.1134/S0555109919040081 (In Russian).
- Egorov AM, Osipov AP, Dzantiev BB, Gavrilova EM. *Teoriya i praktika immunofermentnogo analiza*. M.: Vyssh. shk., 1991. (In Russian).
- Finney DJ. *Statistical method in biological assay*. Charles Griffin & Company, 1978.
- Morris TH. Antibiotic therapeutics in laboratory animals. *Lab Anim*. 1995;29(1):16-36. DOI: 10.1258/002367795780740393
- Dórea JG. Low-dose Thimerosal (ethyl-mercury) is still used in infants' vaccines: Should we be concerned with this form of exposure? *J Trace Elem Med Biol*. 2018;49:134-139. DOI: 10.1016/j.jtemb.2018.05.010

Информация о соавторах:

Бурмистров Егор Андреевич, стажер-исследователь отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Вагайская Анастасия Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Буданова Наталья Юрьевна, кандидат химических наук, научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Трунякова Александра Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Иванов Сергей Андреевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

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

Анисимов Андрей Павлович, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Egor A. Burmistrov, intern researcher of the Department of Biological Technologies State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Anastasiya S. Vagaiskaya, Junior Researcher of laboratory for plague microbiology State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Natalia Yu. Budanova, PhD in Chemical Sciences, Researcher of the Department of Biological Technologies State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Alexandra S. Trunyakova, Junior Researcher of laboratory for plague microbiology State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Tatyana I. Kombarova, PhD in Biological Sciences, Senior Scientist, Biological Testing Laboratory State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Sergey A. Ivanov, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher of laboratory for plague microbiology State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Igor A. Dunaytsev, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher of the Department of Biological Technologies State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Svetlana V. Dentovskaya, MD, PhD, DSc, major researcher of laboratory for plague microbiology State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

Andrey P. Anisimov, MD, PhD, DSc, Professor, associate Director State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

НОВЫЕ КНИГИ

Сибирская язва вчера и сегодня. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Шишкова Н.А., Фирстова В.В. Оболенск; Москва: Династия, 2022. 647 с.: ил., цв. ил.; 27 см.

В книге представлен анализ сведений литературы и результатов собственных многолетних экспериментальных исследований по сибирской язве. Освещено современное состояние эпидемиологии, специфической профилактики, клинической и лабораторной диагностики, включая использование методов геносистематики возбудителя. Приведены особенности сибирской язвы в современных условиях. Дана оценка возможности появления антибиотикорезистентных и иммунорезистентных штаммов возбудителя и приведены рекомендации по профилактике и лечению при заражении такими штаммами. Авторы являются известными специалистами по сибирской язве. Написанная ими книга будет полезной для практических врачей и научных сотрудников, занимающихся изучением проблем сибирской язвы.



База данных «Генетические детерминанты вирулентности и устойчивости к антимикотикам клинических штаммов *Candida* spp.»

Е.А.Горемыкина, П.В.Слукин, О.Е.Хохлова, Н.К.Фурсова

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

База данных «Генетические детерминанты вирулентности и устойчивости к антимикотикам клинических штаммов *Candida* spp.» создана и зарегистрирована в Роспатенте (Свидетельство о регистрации №2022623412 от 13.12.2022), содержит информацию о 104 клинических штаммах *Candida* spp., относящихся к 11 видам, выделенных от пациентов лечебных учреждений г. Москвы в период с 2020 по 2021 г., а также 1 штамм, выделенный из пищевого продукта в Республике Крым в 2009 г. База данных включает в себя 7 таблиц уникальной информации, 6 дополнительных таблиц справочной информации, 2 информационные формы и 1 поисковую форму. База данных позволяет систематизировать, учитывать, хранить, сравнивать, презентовать и анализировать клиническую, эпидемиологическую, микробиологическую и молекулярно-генетическую информацию о клинических штаммах *Candida* spp. Она является дополнительным программным инструментом для фундаментальных и прикладных работ в области эпидемиологических, микробиологических и молекулярно-генетических исследований, предназначена для широкого круга врачей-клиницистов, микробиологов и эпидемиологов.

Ключевые слова: база данных, *Candida*, фенотип, антимикотикорезистентность, вирулентность, биопленкообразование

Для цитирования: Горемыкина Е.А., Слукин П.В., Хохлова О.Е., Фурсова Н.К. База данных «Генетические детерминанты вирулентности и устойчивости к антимикотикам клинических штаммов *Candida* spp. Бактериология. 2023; 8(3): 41–47. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-41-47

The database «Genetical determinants of virulence and antimycotic resistance in clinical *Candida* spp. strains»

E.A.Goremykina, P.V.Slugin, O.E.Khokhlova, N.K.Fursova

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

The database «Genetic determinants of virulence and antimycotic resistance in clinical *Candida* spp. strains» was created and registered in the Rospatent (Certificate of Registration No 2022623412 dated 12/13/2022), containing information about 104 clinical strains of *Candida* spp. belonging to 11 species, isolated from the patients of medical centers in Moscow in the period from 2020 to 2021, and also 1 strain isolated from the food product in the Republic of Crimea in 2009. The database contains 7 tables of unique information, 6 additional tables of reference information, 2 information forms, and 1 search form. The database can be used for systematization, accounting, storage, comparison, and analyzing the clinical, epidemiological, microbiological, and molecular-genetic information about clinical *Candida* spp. strains. It is an additional software tool for fundamental and applied works in the field of epidemiological, microbiological, and molecular-genetic researches, it was designed for a broad range of clinicians, microbiologists, and epidemiologists.

Key words: database, *Candida* spp., phenotype, antimycotic resistance, virulence, biofilm formation

For citation: Goremykina E.A., Slugin P.V., Khokhlova O.E., Fursova N.K. The database «Genetical determinants of virulence and antimycotic resistance in clinical *Candida* spp. strains». Bacteriology. 2023; 8(3): 41–47. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-41-47

Для корреспонденции:

Горемыкина Евгения Андреевна, младший 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: (4967) 36-0079

Статья поступила 04.03.2023, принята к печати 29.09.2023

For correspondence:

Evgenia A. Goremykina, Junior Researcher of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0079

The article was received 04.03.2023, accepted for publication 29.09.2023

Грибковые заболевания в настоящее время привлекают все большее внимание медицинского сообщества из-за растущей популяции лиц с ослабленным иммунитетом [1–3]. Грибы рода *Candida*, являющиеся наиболее распространенными грибами-комменсалами организма человека и часто присутствующие на кожных покровах, слизистых оболочках желудочно-кишечного и мочеполового трактов, все чаще вызывают инфекционные поражения (кандидоз) у людей с иммунными нарушениями, вызванными факторами внешней среды, иммуносупрессирующими препаратами или соматическими заболеваниями [4]. На сегодняшний день кандидоз занимает четвертое место в мире среди инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

Широкая распространенность во всех регионах мира в последние два десятилетия инвазивного кандидоза, вызванного грибами рода *Candida*, обсуждается в значительном количестве научных публикаций [5–7]. Исследования таких инфекций проводятся начиная с 1980-х гг. и до настоящего времени [8]. В них изучаются особенности распространения и передачи возбудителя [9–12], чувствительность к антимикробным препаратам и механизмы формирования устойчивости к ним [9, 13–18], генетические детерминанты вирулентности, оценка уровней вирулентности на биологических моделях [19–25], а также процессы биопленкообразования [16, 21]. Установлено, что наблюдаемая фенотипическая устойчивость кандид к препаратам антимикотиков может формироваться благодаря разным механизмам, таким как точечные мутации в генах клеточных мишеней, избыточная продукция молекул-мишеней, а также выведение из клеток противогрибковых препаратов эффлюксными насосами [22, 26]. Разные виды грибов рода *Candida* обладают многими факторами вирулентности: экзоферменты (фосфолипаза и протеаза), способность продуцировать зародышевую трубку и прикрепляться к клеткам буккального эпителия макроорганизма, что облегчает адгезию и инвазию этих микроорганизмов за счет нарушения функции или разрыва клеточных мембран организма-хозяина. Продукция гемолизина является еще одним фактором вирулентности у грибов рода *Candida*, за счет чего они могут лизировать клетки крови и способствовать распространению инфекции по всему организму-хозяину, развивая септицемию [27].

К настоящему времени достаточно подробно изучены этапы процесса биопленкообразования у кандид, генетические детерминанты и механизмы их регуляции. *Candida albicans* способны формировать высокоструктурированные биопленки, состоящие из нескольких типов клеток (круглые почкующиеся дрожжевые клетки, овальные псевдогифальные клетки и удлинённые клетки гиф), заключенные во внеклеточный матрикс [28]. Белки-адгезины семейств ALS и HWP играют важную роль на начальных этапах формирования биопленок грибами данного вида [29]. Регуляторная сеть транскрипции, состоящая из 6 основных регуляторных генов (*efg1*, *bcr1*, *brg1*, *ndt80*, *tec1* и *rob1*), участвует в контроле процесса формирования биопленок [26]. Все это вызывает необходимость создания пополняемых баз данных (БД) для анализа информации по новым штаммам *Candida* spp., выделяемым из разных источников.

БД представляют собой совокупность данных, содержащих информацию об объектах и их свойствах, систематизи-

рованных таким образом, чтобы они могли быть найдены и обработаны с помощью электронно-вычислительной машины [30]. В настоящее время существуют сотни БД, которые доступны для поиска данных по биологии и другим смежным дисциплинам. Каждая из них имеет свой формат хранения данных, различную степень избыточности, взаимосвязи с родственными или аналогичными базами данных. Каждая БД имеет также свои средства доступа к информации – различные поисковые программы, программные средства визуализации и пополнения базы.

Целью данной работы являлось создание пополняемой БД, позволяющей осуществить поиск и обработку информации по источникам и дате выделения клинических штаммов *Candida* spp., фенотипам и генотипам антимикотикорезистентности, по наличию у них генов вирулентности, а также по степени биопленкообразования и проявлению у них гидролитической активности.

Материалы и методы

Для создания базы данных «Генетические детерминанты вирулентности и устойчивости к антимикотикам клинических штаммов *Candida* spp.» использовали программу Microsoft Office Access 2010 (Microsoft, США) со стандартным пакетом приложений.

Для заполнения таблиц БД использовали информацию о клинических штаммах *Candida* spp. ($n = 103$), выделенных от пациентов лечебных учреждений г. Москвы в период с 2020 по 2021 г., а также из пищевого продукта ($n = 1$) в республике Крым в 2009 г. Для каждого штамма вносили информацию по следующим категориям: клинко-эпидемиологические данные (место и время выделения, биоматериал, диагноз); фенотип антибиотикорезистентности (минимальные подавляющие концентрации антимикробных препаратов и

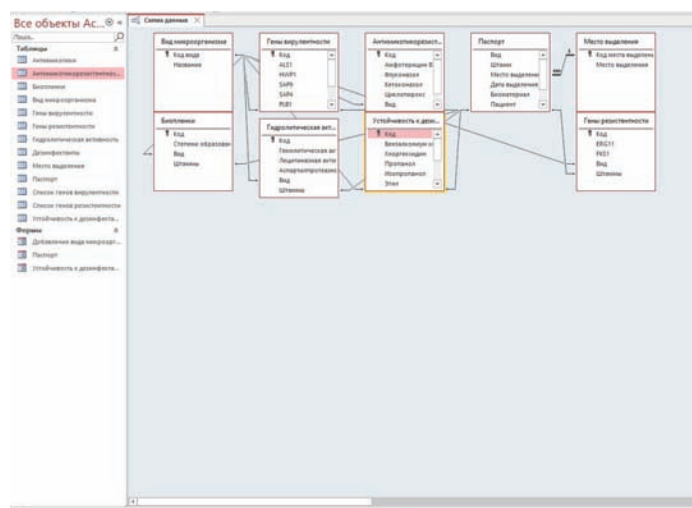


Рис. 1. Схема данных таблиц «Вид микроорганизма», «Гены вирулентности», «Антимикотикорезистентность», «Паспорт», «Место выделения», «Биопленки», «Гидролитическая активность», «Устойчивость к дезинфектантам» и «Гены резистентности».

Fig. 1. Schematic representation of the data Tables: «Microorganism species», «Virulence genes», «Antimycotic resistance», «Certificate», «Place of isolation», «Biofilms», «Hydrolytic activity», «Disinfectant resistance», and «Resistance genes».

Рис. 2. Структура полей таблицы «Паспорт».
Fig. 2. Fields structure of the "Passport" table.

Рис. 3. Структура полей таблицы «Антимикотикорезистентность».
Fig. 3. Fields structure of the "Antimicrobial resistance" table.

антисептиков/дезинфектантов, интерпретация чувствительности); гены антимикорезистентности и вирулентности; а также данные о способности к биопленкообразованию и данные о гидролитической активности (гемолитической, аспартил-протеазной и лецитиназной).

Результаты исследования и их обсуждение

База данных «Генетические детерминанты вирулентности и устойчивости к антимикотикам клинических штаммов *Candida spp.*» включает данные о 104 клинических штаммах *Candida spp.*, относящихся к 11 видам: *C. albicans*, *C. auris*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* и *C. utilis*. База данных содержит 7 таблиц уникальной информации, 6 дополни-

Рис. 4. Структура полей таблицы «Биопленки».
Fig. 4. Fields structure of the "Biofilms" table.

Рис. 5. Структура полей таблицы «Гены вирулентности».
Fig. 5. Fields structure of the "Virulence genes" table.

тельных таблиц справочной информации, 2 информационные формы и 1 поисковую форму (рис. 1). В соответствии с этическими требованиями БД не содержит персональной информации пациентов (имени и фамилии, возраста, этнической и расовой принадлежности и др.).

Объем базы данных составляет 5,37 Mb, что делает ее удобной для просмотра на переносных устройствах.

Таблица уникальной информации «Паспорт» (рис. 2) содержит 6969 ячеек в 8 полях (столбцы характеристик штаммов) и 104 строках (штаммы). Таблица содержит основную эпидемиологическую информацию о каждом штамме.

Таблица уникальной информации «Антимикотикорезистентность» (рис. 3) содержит 6969 ячеек в 7 полях (столбцы характеристики штаммов) и 104 строках (штаммы). Таблица содержит данные о чувствительности клинических

Код	Вид	Штаммы	ERG11	FKS1	Щелкните для добавле...
1	Candida albicans	N51	-	+	
2	Candida kefyr	B2516/20	-	-	
3	Candida kefyr	N14	-	-	
4	Candida albicans	B2755-1/20	-	-	
5	Candida albicans	B2520/20	-	-	
6	Candida albicans	B2527/20	-	+	
7	Candida albicans	B2755-2/20	-	-	
8	Candida glabrata	B2587/20	-	+	
9	Candida albicans	B2560/20	-	-	
10	Candida albicans	2945-2	+	-	
11	Candida albicans	2945-1	+	-	
12	Candida albicans	N253	-	-	
13	Candida albicans	1721	-	-	
14	Candida kefyr	B2341/20	-	+	
15	Candida auris	48/20	-	-	
16	Candida parapsilosis	C9825/16	-	+	
17	Candida parapsilosis	C2747/21	-	+	
18	Candida parapsilosis	C4652/16	-	+	
19	Candida parapsilosis	C1084/15	-	-	
20	Candida parapsilosis	C3718/15	-	+	
21	Candida parapsilosis	C9794/16	-	-	
22	Candida parapsilosis	C8550/16	-	-	
23	Candida parapsilosis	C9798/18	-	-	
24	Candida parapsilosis	C7453/16	-	-	
25	Candida parapsilosis	C863/16	-	-	
26	Candida parapsilosis	C2115/16	-	-	
27	Candida parapsilosis	C5893/16	-	-	
28	Candida parapsilosis	C9715/16	-	-	
29	Candida parapsilosis	C9130/16	-	-	
30	Candida albicans	C3519/21	-	-	
31	Candida parapsilosis	C4176/16	-	-	
32	Candida albicans	C9387/18	+	-	
33	Candida albicans	C5273/20	+	-	
34	Candida glabrata	C9867/16	-	-	
35	Candida parapsilosis	C482/16	-	+	
36	Candida tropicalis	C3724/21	-	-	
37	Candida parapsilosis	C5794/16	-	+	
38	Candida lusitanae	C11647/18	-	-	
39	Candida guilliermondii	C9788/18	-	-	
40	Candida inconspicua	C6148/21	-	-	
41	Candida utilis	C4953/17	-	-	
42	Candida krusei	C2080/20	-	-	

Рис. 6. Структура полей таблицы «Гены резистентности».
 Fig. 6. Fields structure of the "Resistance genes" table.

Код	Вид	Штаммы	Гемолитин	Лецитиназа	Аспартил	Щелкните для добавле...
1	Candida albica	N51	0,6	-	0,45	
2	Candida kefyr	B2516/20	0,6	-	0,7	
3	Candida kefyr	N14	0,6	-	0,3	
4	Candida albica	B2755-1/20	0,6	-	0,4	
5	Candida albica	B2520/20	0,6	-	0,4	
6	Candida albica	B2527/20	0,6	-	0,3	
7	Candida albica	B2755-2/20	0,7	-	0,5	
8	Candida glabr	B2587/20	0,7	-	0,4	
9	Candida albica	B2560/20	0,6	-	0,38	
10	Candida albica	2945-2	0,7	+	0,3	
11	Candida albica	2945-1	2,3	-	0,5	
12	Candida albica	N253	0,7	-	0,3	
13	Candida albica	1721	0,6	-	0,55	
14	Candida kefyr	B2341/20	0,7	-	0,45	
15	Candida auris	48/20	0,8	+	0,5	
16	Candida parap	C9825/16	0,55	-	0,8	
17	Candida parap	C2747/21	0,8	-	0,8	
18	Candida parap	C4652/16	0,8	-	0,8	
19	Candida parap	C1084/15	0,7	-	0,8	
20	Candida parap	C3718/15	0,8	-	0,7	
21	Candida parap	C9794/16	1	-	0,7	
22	Candida parap	C8550/16	1	-	0,8	
23	Candida parap	C9798/18	1	-	0,8	
24	Candida parap	C7453/16	0,6	-	0,7	
25	Candida parap	C863/16	1	-	0,7	
26	Candida parap	C2115/16	0,7	-	0,7	
27	Candida parap	C5893/16	0,6	-	0,8	
28	Candida parap	C9715/16	0,7	-	0,8	
29	Candida parap	C9130/16	0,7	-	0,8	
30	Candida albica	C3519/21	0,7	-	0,8	
31	Candida parap	C4176/16	0,8	-	0,8	
32	Candida albica	C9387/18	0,6	-	0,6	
33	Candida albica	C5273/20	0,6	-	0,4	
34	Candida glabr	C9867/16	0,6	-	0,6	
35	Candida parap	C482/16	1	-	0,7	
36	Candida tropic	C3724/21	0,6	-	0,8	
37	Candida parap	C5794/16	0,8	-	1	
38	Candida lusita	C11647/18	0,7	+	0,8	
39	Candida guilli	C9788/18	0,55	-	0,5	
40	Candida incon	C6148/21	0,8	-	1	
41	Candida utilis	C4953/17	0,6	-	1	
42	Candida krusei	C2080/20	0,5	-	1	

Рис. 7. Структура полей таблицы «Гидролитическая активность».
 Fig. 7. Fields structure of the "Hydrolytic activity" table.

штаммов *Candida* spp. к 4 фунгицидным препаратам разных классов (азолы – флуконазол, кетоконазол; полиены – амфотерецин В; гидроксипиридины – циклопирокс).

Таблица уникальной информации «Биопленки» (рис. 4) содержит 6969 ячеек в 4 полях (столбцы характеристики штаммов) и 104 строках (штаммы). Таблица содержит данные о степени биопленкообразования клинических штаммов *Candida* spp.

Таблица уникальной информации «Гены вирулентности» (рис. 5) содержит данные о наличии генетических детерми-

Код	Вид	Штаммы	Бензалконол	Кларотрол	Протинал	Изокротрол	Тризон	НТ20	Трилон	Милослан	Дезинфектант
1	Candida kefyr	N14	2	32	1,25	1,25	8,75	6,00	0,01	0,375	
2	Candida albica	B2755-1/20	8	1	2,5	1,25	1,00	1,00	0,09	0,0025	0,18
3	Candida albica	B2755-1/20	4	12	1,75	1,75	1,25	1,25	0,29	0,28	0,375
4	Candida albica	B2527/20	4	32	10	2,3	1,60	0,60	0,0025	0,375	
5	Candida albica	B2755-2/20	8	1	1,25	1,25	1,00	0,09	0,0025	0,375	
6	Candida glabr	B2527/20	2	64	2,5	2,5	1,5	0,89	0,02	0,89	
7	Candida albica	B2060/20	8	62	1,25	1,25	1,25	1,25	0,18	0,18	0,18
8	Candida albica	2945-1	8	66	1,25	1,25	1,25	1,25	0,09	0,02	0,68
9	Candida albica	N253	8	64	2,5	2,5	2,5	2,5	0,09	0,01	0,375
10	Candida kefyr	B2452/20	8	64	1,25	1,25	1,25	1,25	0,09	0,08	0,18
11	Candida auris	48/20	16	64	1,75	1,75	1,75	1,75	0,09	0,0025	0,68
12	Candida parap	C2747/21	4	1	2,5	2,5	1,89	0,09	0,0025	0,89	
13	Candida parap	C1084/15	4	1	2,5	2,5	1,69	0,09	0,0025	0,18	
14	Candida parap	C9794/16	1	1	1,75	1,75	1,5	1,25	0,09	0,0025	0,89
15	Candida parap	C8550/16	1	1	1,25	1,25	1,25	1,25	0,09	0,0025	0,89
16	Candida parap	C9798/18	1	1	1,25	1,25	1,25	1,25	0,09	0,0025	0,89
17	Candida albica	C4953/17	4	1	2,5	1,25	1,25	1,25	0,09	0,04	0,375
18	Candida keusei	C2080/20	1	1	1,25	1,25	1,25	1,25	0,09	0,01	0,375
19	Candida tropic	C3724/21	4	1	1,25	1,25	1,25	1,25	0,09	0,0025	0,18
20	Candida albica	C9387/18	3	1	2,5	2,5	1,25	1,25	0,09	0,04	0,375
30	Candida albica	C9476/21	8	1	1,25	2,5	2,2	0,69	0,0025	0,89	

Рис. 8. Структура полей таблицы «Устойчивость к дезинфектантам».
 Fig. 8. Fields structure of the "Disinfectant resistance" table.

Добавление вида микроорганизма

Имя:

Список видов:

- Candida albicans*
- Candida kefyr*
- Candida glabrata*
- Candida auris*
- Candida parapsilosis*
- Candida tropicalis*
- Candida lusitanae*
- Candida guilliermondii*
- Candida inconspicua*
- Candida utilis*
- Candida krusei*

Добавить

Рис. 9. Форма «Добавление вида микроорганизма».
 Fig. 9. Form "Add microorganism species".

нант вирулентности для каждого клинического штамма *Candida* spp.

Таблица уникальной информации «Гены резистентности» (рис. 6) содержит 6969 ячеек в 5 полях (столбцы характеристики штаммов) и 104 строках (штаммы). Таблица содержит данные о наличии генетических детерминант антимикотико-чувствительности к фунгицидным препаратам разных классов у клинических штаммов *Candida* spp.

Таблица уникальной информации «Гидролитическая активность» (рис. 7) содержит 6969 ячеек в 7 полях (столбцы характеристики штаммов) и 104 строках (штаммы). Таблица содержит данные о способности клинических штаммов *Candida* spp. проявлять гидролитическую, лецитиназную и аспартил-протеазную активности, которые связаны с проявлением вирулентных свойств штаммов.

Таблица уникальной информации «Устойчивость к дезинфектантам» (рис. 8) содержит 6969 ячеек в 11 полях (столбцы характеристики штаммов) и 20 строках (штаммы). Таблица содержит данные об устойчивости клинических штаммов *Candida* spp. к 8 дезинфицирующим и антисептическим препаратам разных классов.

Рис. 10. Структура формы «Паспорт».
Fig. 10. "Passport" form structure.

Рис. 11. Форма «Устойчивость к дезинфектантам».
Fig. 11. "Disinfectant resistance" form structure.

Перечень значений ячеек, используемых в основных таблицах, содержится в 6 справочных таблицах: видовая принадлежность штамма – в таблице «Вид микроорганизма», название организации, в которой выделен штамм, – в таблице «Место выделения», названия фунгицидных препаратов – в таблице «Антимикотики», названия антисептиков/дезинфектантов – в таблице «Дезинфектанты», наименования генов вирулентности – в таблице «Список генов вирулентности», названия генов антибиотикорезистентности – в таблице «Список генов резистентности». Дополнительные таблицы позволяют не вводить информацию по определенным группам, а выбирать из списка (рис. 1).

Для добавления вида микроорганизма в таблицу «Вид микроорганизма» была создана форма «Добавление вида микроорганизма», позволяющая вносить данные о виде микроорганизма (рис. 9).

Форма «Паспорт» (рис. 10) предназначена для ввода исходной информации в базу данных, ее редактирования, дополнения и презентации, содержит 2 поля идентификации штамма (Вид и Номер штамма в рабочей коллекции), 4 поля эпидемиологических данных (Дата выделения; Место выделения; Биоматериал; Пациент (содержит данные о поле пациента), 1 поле клинических данных (Диагноз), 4 поля антимикотикорезистентности (Амфотерицин В; Флуконазол; Кетоконазол и Циклопирокс), 2 поля генетических детерминант антимикотикорезистентности (ERG11 и FKS1), 6 полей

генетических маркеров вирулентности (ALS1; HWP1; PLB1; LIP1; SAP4 и SAP9), одно поле степени биопленкообразования (Степень образования биопленок) и три поля данных гидролитической активности (Гемолитическая активность; Лецитиназная активность; Аспартил-протеазная активность).

Форма «Устойчивость к дезинфектантам» (рис. 11) предназначена для ввода исходной информации в базу данных, ее редактирования, дополнения и презентации, содержит 2 поля идентификации штамма (Вид, Название штамма в рабочей коллекции) и 8 полей устойчивости к дезинфектантам (бензалкониум хлорид, хлоргексидин, пропанол, изопропанол, этил (этанол), H₂O₂ (перекись водорода), третичный амин (N,N-бис(3-аминопропил)-додециламин) и молочная кислота).

Все формы, используемые в БД, снабжены интерактивными кнопками и выпадающими списками, а также защищены стандартными для программы Microsoft Office Access 2010 макросами от случайного введения данных.

Таким образом, созданная БД «Генетические детерминанты вирулентности и устойчивости к антимикотикам клинических штаммов *Candida* spp.» предназначена для молекулярно-генетического анализа штаммов *Candida* spp. посредством детекции генов вирулентности и резистентности к антимикотикам. Кроме того, БД может служить инструментом внутривидового типирования штаммов *Candida* spp., данные которого позволят проводить эпидемиологический анализ и оценивать эпидемиологическую ситуацию в разных географических регионах и в разные периоды времени. Описанная БД была использована для генетической характеристики коллекции штаммов *Candida* spp. ($n = 108$), выделенных в 2009–2022 гг. в разных регионах Российской Федерации [31, 32]. Структура и оформление БД могут служить примером для создания похожих баз данных в научных исследованиях.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Funding information

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

Конфликт интересов

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

Conflict of interest

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

Литература

- Eisi H, Ibraheem S, Hisham T, Al-Harbi A, Saidy K, Ali I, et al. Risk factors and outcomes of deep tissue *Candida* invasion in neonates with invasive candidiasis. *Mycoses*. 2022 Jan;65(1):110-119. DOI: 10.1111/myc.13395
- Gavaldà J, Meije Y, Fortún J, Roilides E, Saliba F, Lortholary O, et al.; ESCMID Study Group for Infections in Compromised Hosts. Invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Sep;20 Suppl 7:27-48. DOI: 10.1111/1469-0691.12660

3. Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell*. 2011 Sep;10(9):1173-82. DOI: 10.1128/EC.05085-11
4. Mahalingam SS, Jayaraman S, Pandiyan P. Fungal Colonization and Infections-Interactions with Other Human Diseases. *Pathogens*. 2022 Feb 6;11(2):212. DOI: 10.3390/pathogens11020212
5. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al; Latin American Invasive Mycosis Network. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One*. 2013;8(3):e59373. DOI: 10.1371/journal.pone.0059373
6. Quindós G, Marcos-Arias C, San-Millán R, Mateo E, Eraso E. The continuous changes in the aetiology and epidemiology of invasive candidiasis: from familiar *Candida albicans* to multiresistant *Candida auris*. *Int Microbiol*. 2018 Sep;21(3):107-119. DOI: 10.1007/s10123-018-0014-1
7. Rodriguez L, Bustamante B, Huaroto L, Agurto C, Illescas R, Ramirez R, et al. A multi-centric Study of *Candida* bloodstream infection in Lima-Callao, Peru: Species distribution, antifungal resistance and clinical outcomes. *PLoS One*. 2017 Apr 18;12(4):e0175172. DOI: 10.1371/journal.pone.0175172
8. Schaffner A, Davis CE, Schaffner T, Markert M, Douglas H, Braude AI. In vitro susceptibility of fungi to killing by neutrophil granulocytes discriminates between primary pathogenicity and opportunism. *J Clin Invest*. 1986 Aug;78(2):511-24. DOI: 10.1172/JCI112603
9. Заморская РВ. *Candida albicans* – возбудитель кандидоза у женщин, мужчин и детей: морфология и микробиология, классификация инфекции, эффективные антимикотические препараты. Информационный медицинский портал Sterilnonet. 2017.
10. Arya RN, Rafiq NB. Candidiasis. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021.
11. Dufresne SF, Marr KA, Sydnor E, Staab JF, Karp JE, Lu K, et al. Epidemiology of *Candida kefyr* in patients with hematologic malignancies. *J Clin Microbiol*. 2014 Jun;52(6):1830-7. DOI: 10.1128/JCM.00131-14
12. Farr A, Effendy I, Frey Tirri B, Hof H, Mayser P, Petricevic L, et al. Guideline: Vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072, level S2k). *Mycoses*. 2021 Jun;64(6):583-602. DOI: 10.1111/myc.13248
13. Bhattacharya S, Sae-Tia S, Fries BC. Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. *Antibiotics (Basel)*. 2020 Jun 9;9(6):312. DOI: 10.3390/antibiotics9060312.
14. Bordallo-Cardona MÁ, Sánchez-Carrillo C, Bouza E, Muñoz P, Escibano P, Guinea J. Detection of Echinocandin-Resistant *Candida glabrata* in Blood Cultures Spiked with Different Percentages of FKS2 Mutants. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Feb 26;63(3):e02004-18. DOI: 10.1128/AAC.02004-18
15. Frías-De-León MG, Hernández-Castro R, Conde-Cuevas E, García-Coronel IH, Vázquez-Aceituno VA, Soriano-Ursúa MA, et al. *Candida glabrata* Antifungal Resistance and Virulence Factors, a Perfect Pathogenic Combination. *Pharmaceutics*. 2021 Sep 22;13(10):1529. DOI: 10.3390/pharmaceutics13101529
16. Kean R, Ramage G. Combined Antifungal Resistance and Biofilm Tolerance: the Global Threat of *Candida auris*. *mSphere*. 2019 Jul 31;4(4):e00458-19. DOI: 10.1128/mSphere.00458-19
17. Lee Y, Puumala E, Robbins N, Cowen LE. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. *Chem Rev*. 2021 Mar 24;121(6):3390-3411. DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c00199
18. Mataraci-Kara E, Ataman M, Yilmaz G, Ozbek-Celik B. Evaluation of antifungal and disinfectant-resistant *Candida* species isolated from hospital wastewater. *Arch Microbiol*. 2020 Nov;202(9):2543-2550. DOI: 10.1007/s00203-020-01975-z
19. Deorukhkar SC, Saini S, Mathew S. Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of *Candida tropicalis* and Its Antifungal Susceptibility Profile. *Int J Microbiol*. 2014;2014:456878. DOI: 10.1155/2014/456878
20. Feng W, Yang J, Ma Y, Xi Z, Zhao X, Zhao X, et al. The effects of secreted aspartyl proteinase inhibitor ritonavir on azoles-resistant strains of *Candida albicans* as well as regulatory role of SAP2 and ERG11. *Immun Inflamm Dis*. 2021 Sep;9(3):667-680. DOI: 10.1002/iid3.415
21. García-Carnero LC, Clavijo-Giraldo DM, Gómez-Gaviria M, Lozoya-Pérez NE, Tamez-Castrellón AK, López-Ramírez LA, et al. Early Virulence Predictors during the *Candida* Species – *Galleria mellonella* Interaction. *J Fungi (Basel)*. 2020 Aug 27;6(3):152. DOI: 10.3390/jof6030152
22. Hernando-Ortiz A, Eraso E, Quindós G, Mateo E. Candidiasis by *Candida glabrata*, *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in *Galleria mellonella*: Virulence and Therapeutic Responses to Echinocandins. *J Fungi (Basel)*. 2021 Nov 23;7(12):998. DOI: 10.3390/jof7120998
23. Mroczynska M, Brillowska-Dąbrowska A. Virulence of Clinical *Candida* Isolates. *Pathogens*. 2021 Apr 12;10(4):466. DOI: 10.3390/pathogens10040466
24. Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2001 Nov;44(9-10):361-7. DOI: 10.1046/j.1439-0507.2001.00685.x
25. Staniszewska M, Bondaryk M, Pilat J, Siennicka K, Magda U, Kurzatkowski W. Czynniki zjadliwości *Candida albicans* [Virulence factors of *Candida albicans*]. *Przegl Epidemiol*. 2012;66(4):629-33. (In Polish).
26. Sanglard D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. *Front Med (Lausanne)*. 2016 Mar 15;3:11. DOI: 10.3389/fmed.2016.00011
27. Nouraei H, Pakshir K, ZareShahrabadi Z, Zomorodian K. High detection of virulence factors by *Candida* species isolated from bloodstream of patients with candidemia. *Microb Pathog*. 2020 Dec;149:104574. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104574
28. Pereira R, Dos Santos Fontenelle RO, de Brito EHS, de Morais SM. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *J Appl Microbiol*. 2021 Jul;131(1):11-22. DOI: 10.1111/jam.14949
29. Еноктаева ОВ, Николенко МВ, Трушников ДЮ, Барышникова НВ, Соловьева СВ. Механизм формирования биопленок грибов рода *Candida* при кандидозной инфекции (обзор литературы). *Проблемы медицинской микологии*. 2021;23(4):3-8. DOI: 10.24412/1999-6780-2021-4-3-8
30. Стефанов ВЕ, Тулуб АА, Мавропуло-Столяренко ГР. Биоинформатика: учебник для вузов. М.: Издательство Юрайт, 2023.
31. Горемыкина ЕА, Слукин ПВ, Подгорная НН, Хохлова ОЕ, Фурсова НК. Оценка вирулентности штаммов *Candida* spp. на модели личинок *Galleria mellonella*. Материалы Всероссийского Конгресса по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXV Кашкинские чтения), Санкт-Петербург, 8-10 июня 2022 г. *Проблемы медицинской микологии*. 2022;2:62.
32. Горемыкина ЕА, Слукин ПВ, Детушев КВ, Багирова НС, Григорьевская ЗВ, Хохлова ОЕ, и др. Анализ генов антибиотикорезистентности клинических штаммов *Candida* spp. Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы научного обеспечения противозидемической защиты населения» в рамках VI Национального конгресса бактериологов, Казань. *Бактериология*. 2021;6(3):29-30.

References

1. Eisi H, Ibraheem S, Hisham T, Al-Harbi A, Saidy K, Ali I, et al. Risk factors and outcomes of deep tissue *Candida* invasion in neonates with invasive candidiasis. *Mycoses*. 2022 Jan;65(1):110-119. DOI: 10.1111/myc.13395
2. Gavalda J, Meije Y, Fortún J, Roilides E, Saliba F, Lortholary O, et al.; ESCMID Study Group for Infections in Compromised Hosts. Invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Sep;20 Suppl 7:27-48. DOI: 10.1111/1469-0691.12660
3. Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell*. 2011 Sep;10(9):1173-82. DOI: 10.1128/EC.05085-11
4. Mahalingam SS, Jayaraman S, Pandiyan P. Fungal Colonization and Infections-Interactions with Other Human Diseases. *Pathogens*. 2022 Feb 6;11(2):212. DOI: 10.3390/pathogens11020212

5. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al; Latin American Invasive Mycosis Network. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One*. 2013;8(3):e59373. DOI: 10.1371/journal.pone.0059373
6. Quindós G, Marcos-Arias C, San-Millán R, Mateo E, Eraso E. The continuous changes in the aetiology and epidemiology of invasive candidiasis: from familiar *Candida albicans* to multiresistant *Candida auris*. *Int Microbiol*. 2018 Sep;21(3):107-119. DOI: 10.1007/s10123-018-0014-1
7. Rodriguez L, Bustamante B, Huaroto L, Agurto C, Illescas R, Ramirez R, et al. A multi-centric Study of *Candida* bloodstream infection in Lima-Callao, Peru: Species distribution, antifungal resistance and clinical outcomes. *PLoS One*. 2017 Apr 18;12(4):e0175172. DOI: 10.1371/journal.pone.0175172
8. Schaffner A, Davis CE, Schaffner T, Markert M, Douglas H, Braude AI. *In vitro* susceptibility of fungi to killing by neutrophil granulocytes discriminates between primary pathogenicity and opportunism. *J Clin Invest*. 1986 Aug;78(2):511-24. DOI: 10.1172/JCI112603
9. Zamorskaya RV. *Candida albicans* – the causative agent of candidiasis in women, men and children: morphology and microbiology, infection classification, effective antimicrobial drugs. Information Medical Portal Sterilnonet. 2017. (In Russian).
10. Arya RN, Rafiq NB. Candidiasis. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021.
11. Dufresne SF, Marr KA, Sydnor E, Staab JF, Karp JE, Lu K, et al. Epidemiology of *Candida kefyr* in patients with hematologic malignancies. *J Clin Microbiol*. 2014 Jun;52(6):1830-7. DOI: 10.1128/JCM.00131-14
12. Farr A, Effendy I, Frey Tirri B, Hof H, Mayser P, Petricevic L, et al. Guideline: Vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072, level S2k). *Mycoses*. 2021 Jun;64(6):583-602. DOI: 10.1111/myc.13248
13. Bhattacharya S, Sae-Tia S, Fries BC. Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. *Antibiotics* (Basel). 2020 Jun 9;9(6):312. DOI: 10.3390/antibiotics9060312.
14. Bordallo-Cardona MÁ, Sánchez-Carrillo C, Bouza E, Muñoz P, Escribano P, Guinea J. Detection of Echinocandin-Resistant *Candida glabrata* in Blood Cultures Spiked with Different Percentages of FKS2 Mutants. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Feb 26;63(3):e02004-18. DOI: 10.1128/AAC.02004-18
15. Frías-De-León MG, Hernández-Castro R, Conde-Cuevas E, García-Coronel IH, Vázquez-Aceituno VA, Soriano-Ursúa MA, et al. *Candida glabrata* Antifungal Resistance and Virulence Factors, a Perfect Pathogenic Combination. *Pharmaceutics*. 2021 Sep 22;13(10):1529. DOI: 10.3390/pharmaceutics13101529
16. Kean R, Ramage G. Combined Antifungal Resistance and Biofilm Tolerance: the Global Threat of *Candida auris*. *mSphere*. 2019 Jul 31;4(4):e00458-19. DOI: 10.1128/mSphere.00458-19
17. Lee Y, Puumala E, Robbins N, Cowen LE. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. *Chem Rev*. 2021 Mar 24;121(6):3390-3411. DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c00199
18. Mataraci-Kara E, Ataman M, Yilmaz G, Ozbek-Celik B. Evaluation of antifungal and disinfectant-resistant *Candida* species isolated from hospital wastewater. *Arch Microbiol*. 2020 Nov;202(9):2543-2550. DOI: 10.1007/s00203-020-01975-z
19. Deorukhkar SC, Saini S, Mathew S. Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of *Candida tropicalis* and Its Antifungal Susceptibility Profile. *Int J Microbiol*. 2014;2014:456878. DOI: 10.1155/2014/456878
20. Feng W, Yang J, Ma Y, Xi Z, Zhao X, Zhao X, et al. The effects of secreted aspartyl proteinase inhibitor ritonavir on azoles-resistant strains of *Candida albicans* as well as regulatory role of SAP2 and ERG11. *Immun Inflamm Dis*. 2021 Sep;9(3):667-680. DOI: 10.1002/iid3.415
21. García-Carnero LC, Clavijo-Giraldo DM, Gómez-Gaviria M, Lozoya-Pérez NE, Tamez-Castrellón AK, López-Ramírez LA, et al. Early Virulence Predictors during the *Candida* Species – *Galleria mellonella* Interaction. *J Fungi* (Basel). 2020 Aug 27;6(3):152. DOI: 10.3390/jof6030152
22. Hernando-Ortiz A, Eraso E, Quindós G, Mateo E. Candidiasis by *Candida glabrata*, *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in *Galleria mellonella*: Virulence and Therapeutic Responses to Echinocandins. *J Fungi* (Basel). 2021 Nov 23;7(12):998. DOI: 10.3390/jof7120998
23. Mroczyńska M, Brillowska-Dąbrowska A. Virulence of Clinical *Candida* Isolates. *Pathogens*. 2021 Apr 12;10(4):466. DOI: 10.3390/pathogens10040466
24. Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2001 Nov;44(9-10):361-7. DOI: 10.1046/j.1439-0507.2001.00685.x
25. Staniszewska M, Bondaryk M, Piłat J, Siennicka K, Magda U, Kurzatkowski W. Czynniki zjadliwości *Candida albicans* [Virulence factors of *Candida albicans*]. *Przegl Epidemiol*. 2012;66(4):629-33. (In Polish).
26. Sanglard D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. *Front Med* (Lausanne). 2016 Mar 15;3:11. DOI: 10.3389/fmed.2016.00011
27. Nouraei H, Pakshir K, ZareShahrabadi Z, Zomorodian K. High detection of virulence factors by *Candida* species isolated from bloodstream of patients with candidemia. *Microb Pathog*. 2020 Dec;149:104574. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104574
28. Pereira R, Dos Santos Fontenelle RO, de Brito EHS, de Morais SM. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *J Appl Microbiol*. 2021 Jul;131(1):11-22. DOI: 10.1111/jam.14949
29. Enoktaeva OV, Nikolenko MV, Trushnikov DYu, Baryshnikova NV, Solov'eva SV. Fungal biofilms formation mechanism of the genus *Candida* fungi in candida infection (literature review). *Problems of Medical Mycology*. 2021;23(4):3-8. DOI: 10.24412/1999-6780-2021-4-3-8 (In Russian).
30. Stefanov VE, Tulub AA, Mavropulo-Stolyarenko GR. Bioinformatics: a textbook for universities. Moscow: Yurayt Publishing House, 2023. (In Russian).
31. Goremykina EA, Slukin PV, Podgornaya NN, Khokhlova OE, Fursova NK. Evaluation of virulence of *Candida* spp strains. on the model of *Galleria mellonella* larvae. Materials of the All-Russian Congress on Medical Microbiology, Clinical Mycology and Immunology (XXV Kashkin Readings), St. Petersburg, June 8-10, 2022. *Problems of medical Mycology*. 2022;2:62. (In Russian).
32. Goremykina EA, Slukin PV, Detushev KV, Bagirova NS, Grigorievskaya ZV, Khokhlova OE, et al. Analysis of antibiotic resistance genes of clinical strains of *Candida* spp. Materials of the All-Russian scientific and practical conference "Topical issues of scientific provision of antiepidemic protection of the population" within the framework of the VI National Congress of Bacteriologists, Kazan. *Bacteriology*. 2021;6(3):29-30. (In Russian).

Информация о соавторах:

Слукин Павел Владимирович, научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Хохлова Ольга Евгеньевна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Information about co-authors:

Pavel V. Slukin, Researcher of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor

Olga E. Khokhlova, MD, PhD, DSc, Chief researcher of antimicrobial agents laboratory, Molecular Microbiology departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor

Nadezhda K. Fursova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of antimicrobial agents laboratory, Molecular Microbiology departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosptrebnadzor

Разработка дуплексной петлевой изотермической амплификации LAMP для детекции *Listeria monocytogenes*

А.Г.Шевяков, И.Ю.Щит, В.Н.Борзенков, С.Ф.Бикетов, С.С.Ветчинин

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

Листериоз – заболевание, вызываемое *Listeria monocytogenes*, – представляет значительную угрозу жизни и здоровью людей с ослабленной иммунной системой, пожилых и новорожденных. Заболевание проявляется в виде различных патологий центральной нервной системы, менингоэнцефалита, сепсиса, может приводить к выкидышу. Основной путь заражения – алиментарный. Для контроля качества пищевых продуктов необходима разработка новых высокоспецифичных методов контроля патогенных листерий.

В работе показана возможность высокоспецифичного и чувствительного обнаружения патогенных *L. monocytogenes* с помощью петлевой изотермической амплификации LAMP. Этот метод позволяет амплифицировать небольшое количество копий целевой ДНК с высокой специфичностью, эффективностью и скоростью в изотермических условиях с использованием набора из четырех специально подобранных праймеров и ДНК-полимеразы, способной проводить амплификацию с вытеснением матричной цепи. В связи с этим значительно смягчаются требования к используемому оборудованию, так как отсутствует необходимость в термоциклировании, и квалификации персонала. Предложенный метод позволяет обнаружить $1,7 \cdot 10^1$ КОЕ/мл патогенных листерий при использовании двух наборов специально подобранных праймеров для LAMP – Lm-prfa и Lm-iap.

Ключевые слова: листериоз, *Listeria monocytogenes*, петлевая изотермическая амплификация, LAMP

Для цитирования: Шевяков А.Г., Щит И.Ю., Борзенков В.Н., Бикетов С.Ф., Ветчинин С.С. Разработка дуплексной петлевой изотермической амплификации LAMP для детекции *Listeria monocytogenes*. Бактериология. 2023; 8(3): 48–55. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-48-55

Development of duplex loop isothermal LAMP amplification for the detection of *Listeria monocytogenes*

A.G.Shevyakov, I.Yu.Shchit, V.N.Borzenkov, S.F.Biketov, S.S.Vetchinin

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

Listeriosis – a disease caused by *Listeria monocytogenes*, poses a significant threat to the life and health of people with weakened immune systems, the elderly and newborns. The disease manifests itself in the form of various pathologies of the central nervous system, meningoencephalitis, sepsis, can lead to miscarriage. The main way of infection is alimentary. To control the quality of food products, it is necessary to develop new highly specific methods for controlling pathogenic listeria.

The paper shows the possibility of highly specific and sensitive detection of pathogenic *L. monocytogenes* using loop isothermal amplification – LAMP. This method allows amplification of a small number of copies of the target DNA with high specificity, efficiency and speed under isothermal conditions using a set of four specially selected primers and DNA polymerase capable of amplification with displacement of the matrix chain. In this regard, the requirements for the equipment used are significantly reduced, since there is no need for thermal cycling. The proposed method makes it possible to detect $1,7 \cdot 10^1$ CFU/ml of pathogenic listeria using two sets of specially selected primers for LAMP – Lm-prfa and Lm-iap.

Key words: listeriosis, *Listeria monocytogenes*, loop isothermal amplification, LAMP

For citation: Shevyakov A.G., Shchit I.Yu., Borzenkov V.N., Biketov S.F., Vetchinin S.S. Development of duplex loop isothermal LAMP amplification for the detection of *Listeria monocytogenes*. Bacteriology. 2023; 8(3): 48–55. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-48-55

Для корреспонденции:

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

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
E-mail: shevyakov@obolensk.org

Статья поступила 20.06.2023, принята к печати 29.09.2023

For correspondence:

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

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
E-mail: shevyakov@obolensk.org

The article was received 20.06.2023, accepted for publication 29.09.2023

Современные методы производства и дистрибуции продуктов питания дают возможность в короткие сроки изготовить и поставить в торговые сети значительные объемы разнообразных пищевых продуктов. Недостаточный микробиологический контроль на этапах производства и хранения может привести к контаминации продуктов патогенными микроорганизмами и вызвать вспышку заболевания у потребителей на большой территории. В связи с вышеуказанным значительный интерес представляет разработка способов быстрой, высокоточной и чувствительной диагностики патогенных микроорганизмов [1].

Одним из представителей группы алиментарных патогенов является *Listeria monocytogenes* – грамположительная бактерия, факультативный анаэроб, вызывающая серьезные спорадические и эпидемические заболевания листериозом у людей. Бактерии *L. monocytogenes* широко распространены в окружающей среде, встречаются на всех континентах (найлены в почве, донных отложениях, сточных водах, на поверхности растений), обладают способностью размножаться в широком диапазоне температур (от -1,5 до +45°C), значений pH (5–11), устойчивы к гипертоническим условиям (до 10% NaCl) [2].

Носительство листерий у животных в фермерских хозяйствах, животноводческих компаниях практически невозможно устранить. Большинство растительных, особенно сочных, кормов содержат эти бактерии. Животные, выращиваемые на подобных кормах, являются источником контаминации листериями как внешней среды, так и продуктов животноводства. Например, мастит коров, вызванный листериями, может протекать бессимптомно и приводить к заражению молока. Таким образом, клинически здоровые животные могут являться источником контаминации пищевого сырья, а в дальнейшем и конечной продукции.

Листерии часто обнаруживаются на предприятиях, производящих продукты питания. Проникновение возбудителя в производственные цепочки происходит как с исходным сырьем, так и при перемещении людей и аппаратов внутри производства. Благодаря способности закрепляться и образовывать биопленки на поверхностях, встречающихся в производстве пищевых продуктов, *L. monocytogenes* может реконтаминировать продукты, прошедшие стерилизационную обработку. Недостаточный контроль за санитарными условиями и/или непродуманная организация производственной цепочки может привести к появлению очага контаминации готовой продукции. Несоблюдение холодовой цепи при доставке и хранении продуктов в розничной торговле также может приводить к значительному увеличению количества этих микроорганизмов в случае контаминации [3].

Особенностью листериоза является полиморфизм клинических проявлений – поражение центральной нервной системы (ЦНС), миндалин, лимфатических узлов, печени, селезенки. Бактерии, проникнув через стенку кишечника в кровеносные сосуды, с током крови могут попасть в различные отделы ЦНС, преодолевая барьерные механизмы, и вызывать менингит, менингоэнцефалит, в редких случаях – такие тяжелые осложнения, как гидроцефалия и внутримозговые кровоизлияния [4]. Основным путем заражения листериозом – алиментарный, в результате употребления контаминированных пищевых продуктов, реже воды из открытых

источников, растений. Особо стоит отметить возможность трансплацентарного инфицирования плода от матери. Листериоз характеризуется высоким уровнем госпитализации и смертности (среди групп риска может достигать 30–50%). Основную опасность это заболевание представляет для людей с нарушениями в работе иммунной системы, проходящих курс иммуносупрессии, пожилых, беременных женщин и новорожденных. Мета-анализ исследований вспышек листериоза за последние 20 лет показывает значительную долю перинатального листериоза с показателем смертности, достигающим до 50% при общем уровне около 30% [5].

При контроле пищевых продуктов на загрязненность патогенными микроорганизмами предусматривается отсутствие микроорганизмов *L. monocytogenes* в 25 г продуктов массового назначения и в 50–100 г продуктов детского и специального питания [6].

Для обнаружения патогенных листерий используют ряд методов: культуральные с биохимической идентификацией, молекулярно-генетические, иммунологические, биопробы на мышах. Культуральная идентификация – точный метод, требующий около 2–3 дней культивирования бактерий на селективных средах, после чего проводят морфологическое, биохимическое, серологическое подтверждение принадлежности выделенной культуры к патогенным листериям. Этот подход признан золотым стандартом, однако требует значительных трудозатрат и времени, что не удовлетворяет современным потребностям в быстром результате. Следует отметить, что бактерии, выделяемые из анализируемых образцов, могут находиться в стрессовом состоянии после воздействия экстремальных внешних условий (pH, осмолярность, температура) и может потребоваться некоторое дополнительное время для восстановления нормального роста. В результате культуральный метод диагностики бактерий в исследуемом образце может дополнительно затягиваться и усложняться.

Молекулярно-генетические методы заключаются в различных вариантах амплификации ДНК специально отобранных генов-мишеней с последующей детекцией полученного ампликона. Основным лабораторным методом является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Диагностика методом ПЦР получила повсеместное распространение и широко используется в различных лабораториях. Скорость проведения исследования в сравнении с культуральным методом значительно выше, так как для получения необходимого в диагностике количества бактерий не требуется длительное культивирование. Тем не менее этот метод не лишен недостатков. При проведении ПЦР-диагностики требуется хорошо оснащенная лаборатория с квалифицированным персоналом, сама реакция чувствительна к пробоподготовке образца (широкий спектр веществ-примесей ингибируют амплификацию). В связи с этим разработка молекулярно-генетических методов не остановилась на ПЦР и были предложены некоторые другие способы амплификации нуклеиновых кислот. Одним из таких методов является изотермическая амплификация [7].

Изотермическая амплификация – привлекательная альтернатива ПЦР, поскольку для нее не требуется дорогостоящее оборудование и сложная пробоподготовка образцов, требования к квалификации оператора более мягкие.

Реакцию можно проводить на месте отбора проб, в полевых условиях, у постели больного. Описано несколько методических подходов для проведения изотермической амплификации. Среди них наиболее широко изучена и применяется петлевая изотермическая амплификация LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) [8]. В отличие от ПЦР, в методе LAMP используется ДНК-полимераза (например, Bst), способная синтезировать дочернюю копию нуклеиновой кислоты при фиксированной температуре. Отличительной особенностью этого метода является высокая толерантность к ингибиторам амплификации, которые затрудняют или блокируют амплификацию методом ПЦР. С помощью этого метода возможно обнаружение нуклеиновых кислот различных патогенов, например малярии [9], возбудителей особо опасных инфекций [10], вирусной РНК ВИЧ с помощью LAMP с обратной транскрипцией [11], геном-модифицированных организмов [12], ДНК человека в криминалистике [13].

В литературе описаны различные варианты использования изотермической амплификации в диагностике патогенных листерий. В качестве генов-мишеней авторы использовали гены *iap* [14], *hlyA* [15], *prfA* [16], *lmo0753* [17], *lmo0460* [18] и некоторые другие.

Известно, что выживание *L. monocytogenes* в неблагоприятных условиях желудочно-кишечного тракта зависит от различных механизмов поддержания гомеостаза. Набор генов, обеспечивающих вирулентность и поддержание гомеостаза клеток *L. monocytogenes*, находится в регулоне вирулентности PrfA. Нуклеотидная последовательность *prfA* уникальна для семейства *Listeriaceae* [16]. Ген *iap* кодирует белок р60, выполняющий функции пептидогликангидролазы и участвующий в процессе деления листерий. Уровень секреции белка р60 напрямую влияет на патогенность листерий [19]. Нуклеотидная последовательность гена *iap* также имеет уникальные участки, специфичные для *L. monocytogenes*, что позволяет использовать его в молекулярной диагностике. В данной работе исследована возможность использования комбинации наборов праймеров к нуклеотидным последовательностям *prfA* и *iap* *L. monocytogenes* для высокоспецифичной диагностики с помощью LAMP.

Материалы и методы исследования

Штаммы микроорганизмов

В работе использовали 52 штамма листерий: *L. monocytogenes* ($n = 37$), *L. innocua* ($n = 5$), *L. ivanovii* ($n = 3$), *L. seeligeri* ($n = 2$), *L. welshimeri* ($n = 2$), *L. grayi* ($n = 3$) и 6 штаммов гетерологичных бактерий, полученных из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Штаммы листерий культивировали в листериозном питательном бульоне ПБЛ (ГНЦ ПМБ, Россия), гетерологичные штаммы выращивали в жидком бульоне LB (Becton-Dickinson, США) при 37°C с перемешиванием. Для определения концентрации бактерий готовили 10-кратные серийные разведения ночной культуры штамма *L. monocytogenes* NCTC11994, отбирали по 100 мкл и высевали на чашки Петри с агаризованной питательной средой ПАЛ (Оболенск) в трех повторах. Через 48 ч культивирования при 30°C проводили визуальный подсчет колоний.

Пробоподготовка образцов

Для выделения бактериальной ДНК использовали ночную культуру в жидкой питательной среде. Аликвоту культурального бульона объемом 1,0 мл центрифугировали при 12 000 г 3 мин, бактериальный осадок ресуспендировали в 100 мкл буфера TE (10 мМ Трис-Cl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0). Полученную суспензию прогревали при 100°C в течение 5 мин для извлечения ДНК. После центрифугирования при 12 000 г в течение 3 мин полученный супернатант использовали в LAMP. Для определения чувствительности использовали серийные разведения ночной культуры *L. monocytogenes* NCTC11994 после определения концентрации на агаризованной среде в диапазоне $1 \cdot 10^1 - 1 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. Выделение ДНК проводили по указанной выше методике. В качестве отрицательного контроля использовали стерильную деионизованную воду.

Праймеры и условия проведения амплификации

Нуклеотидные последовательности генов *prfA* и *iap* брали из базы данных GenBank. Для *prfA*: AJ002742.1, JN703902.1, JN703901.1, JN703896.1, EU294568.1, EU294523.1, EU294567.1, CAA43524.1. Для *iap*: AF532293.1, AF532227.1, JF967604.1, JF967601.1, AF532287.1, AF532277.1, AF532259.1, JF967606.1. Множественное выравнивание с определением консенсуса нуклеотидной последовательности проводили с помощью программы MegAlignPro 17.3 (DNASTAR, США). Поиск и анализ видоспецифических праймеров к *L. monocytogenes* проводили с помощью веб-сервиса «Primer Explorer V5» (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>). Выбранные нуклеотидные последовательности представлены в табл. 1. Синтез праймеров осуществляли в компании «Евроген» (Россия).

На рис. 1, 2 приводится расположение LAMP-праймеров на нуклеотидных последовательностях целевых участков генов *prfA* и *iap* соответственно.

Изотермическая амплификация

Реакция LAMP проводилась в объеме 25 мкл с использованием по 0,2 μM F3 и B3, по 1,6 μM FIP и BIP, 2,5 мкл 10x буферного раствора для LAMP (New England Biolabs, США),

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров к генам *prfA* и *iap*

Table 1. Nucleotide sequences of primers for genes *prfA* and *iap*

Ген-мишень / Target gene	Название праймера / Primer name	Нуклеотидная последовательность / Nucleotide sequence
<i>prfA</i>	Lm-prfa Lm-prfaF3	GATCCACAAGAATATTGTATTTCC
	Lm-prfaB3	GCTCAGTAGTCTTTTAGTTCCG
	Lm-prfaFIP	CCAGACATTATAACGAAAGCACCTAAA GCTTACAAGTATTAGCGAGA
	Lm-prfaBIP	GATACAGAACATCGGTTGGCTATTTG ATAACGTATGCGGTAG
<i>iap</i>	Lm-iap Lm-iapF3	GAAAAGCTTATTCATGGGGT
	Lm-iapB3	CGTAGATACCAACGTGAGAA
	Lm-iapFIP	GGAGATTCGCGCTTTAGCAAATCTTT CGGACCAACTACATTTGATTG
	Lm-iapBIP	CGCACAAATACGCTAGCACTACATTTCC GCTACCATAGTCAAAGA

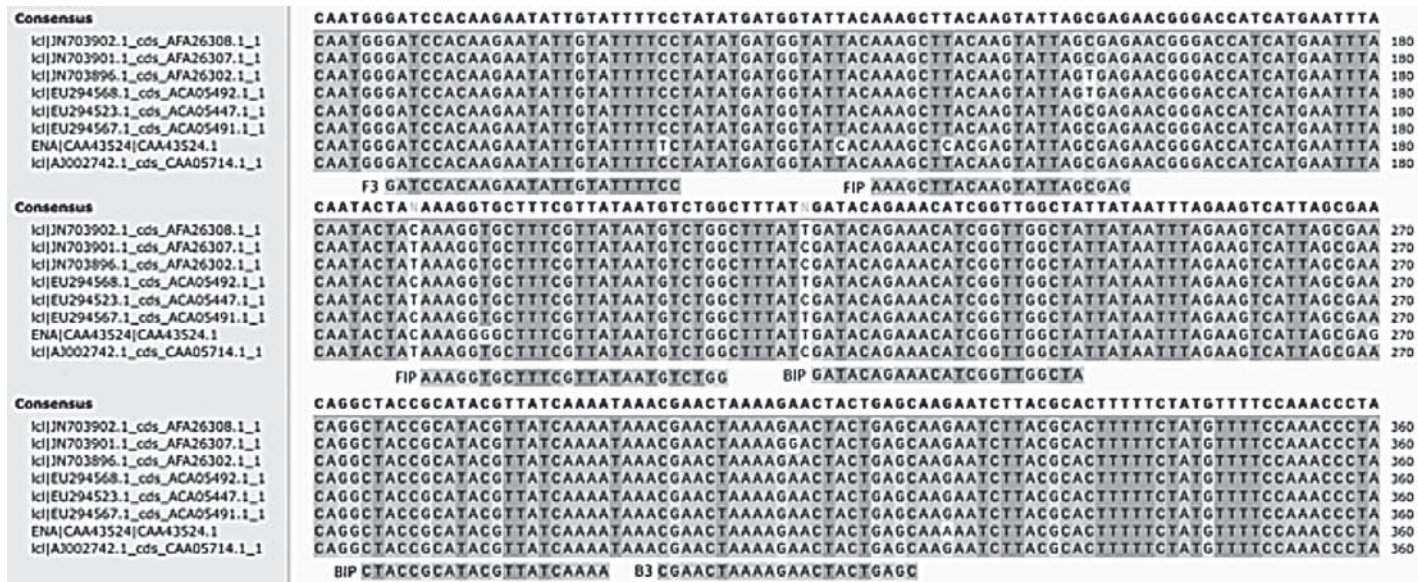


Рис. 1. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей *prfA* нескольких штаммов *L. monocytogenes* и праймеров для LAMP. Для поиска праймеров использовали участок 91–360 н.о. *prfA*. Оттенками серого обозначены разные нуклеотиды.
 Fig. 1. Multiple *prfA* nucleotide sequence alignment of several *L. monocytogenes* strains and LAMP primers. To search for primers, the 91–360 nt *prfA* region was used. Shades of gray represent different nucleotides.



Рис. 2. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *iap* нескольких штаммов *L. monocytogenes* и праймеров для LAMP. Для поиска праймеров использовали участок 1140–1360 н.о. *iap*. Оттенками серого обозначены разные нуклеотиды.
 Fig. 2. Multiple alignment of the *iap* gene nucleotide sequences of several *L. monocytogenes* strains and primers for LAMP. To search for primers, the 1140–1360 nt *iap* region was used. Shades of gray represent different nucleotides.

1,4 мМ дНТФ (NEB, США), 0,8 М бетаина (Sigma-Aldrich, США), 8 IU полимеразы Bst (NEB, США) и 5 мкл образца ДНК. Стерильной деионизованной водой доводили объем до 25 мкл. В качестве отрицательного контроля использовали воду для инъекций, для положительного контроля использовали ДНК, выделенную из штамма *L. monocytogenes* 12 ИП. Реакция проводилась при 63°C 45 мин и останавливалась прогревом до 80°C 2 мин. Нагрев проводили в твердотельном термостате «Гном» («ДНК-технологии», Россия).

Анализ продуктов реакции LAMP

Ампликоны LAMP определяли визуально по свечению интеркалирующего красителя SYTO 82 (Invitrogen, США) при

ультрафиолетовом (УФ) облучении в трансиллюминаторе (Vilber Lourmat, Франция) и светодиодом UV-LED (Китай), излучающим УФ ближнего диапазона. О положительной реакции судили по появлению интенсивного желто-зеленого свечения. Амплифицированный продукт также определяли с помощью электрофореза в 1,0%-м агарозном геле.

Результаты исследования и их обсуждение

В данном исследовании была изучена возможность применения набора праймеров в диагностике патогенных>Listeria

Таблица 2. Результаты изотермической амплификации ДНК панели штаммов патогенных листерий и гетерологичных бактерий

Table 2. Results of isothermal amplification of DNA from a panel of pathogenic listeria strains and heterologous bacteria]

Вид и штамм исследованных микроорганизмов / Type and strain of the investigated microorganisms	Набор праймеров / Primer kit		Итог / Result	
	Lm-iap	LM-prfa		
<i>L. monocytogenes</i>	4ИП	+	+	+
	12ИП	+	+	+
	13ИП	+	+	+
	20ИП	+	+	+
	46ИП	+	+	+
	53ИП	+	+	+
	61ИП	+	+	+
	EGD-e	+	+	+
	NCTC10527	+	+	+
	NCTC10357	+	+	+
	NCTC11994	-	+	+
	NCTC7973	+	+	+
	766	+	+	+
	766ИП	+	+	+
	C52	+	+	+
	C664	-	+	+
	M-1	+	+	+
	M-2	-	+	+
	M-3	+	+	+
	M-4	+	+	+
	M-5	-	+	+
	M-6	+	+	+
	944	+	+	+
	4486	+	+	+
	4701	+	+	+
	4908	+	-	+

	4909	+	+	+
	4910	+	+	+
	4913	+	+	+
	OP513/2	+	+	+
	OP517/7	+	+	+
	B2016/1	+	+	+
	B2016/2	+	+	+
	Тв2016/1	+	+	+
	Тв2016/2	+	-	+
	ATCC19111	+	+	+
	ATCC7644	+	+	+
<i>L. innocua</i>	NCTC11288	-	-	-
	K664	-	-	-
	29ИП	-	-	-
	32ИП	-	-	-
	МСЧ-164	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	4912	-	-	-
	ATCC19119	-	-	-
	NCTC11840	-	-	-
<i>L. seeligeri</i>	SLCC3954	-	-	-
	NCTC11856	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	4911	-	-	-
	47ИП	-	-	-
<i>L. grayi</i>	ATCC25401	-	-	-
	C214	-	-	-
	МКМ1	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC14579	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC14028	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538	-	-	-
<i>Escherichia coli O157</i>	ATCC43888	-	-	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	C79	-	-	-
<i>Brucella abortus</i>	19	-	-	-

ров к ним. Использование генов *prfA* и *iap* *L. monocytogenes* обусловлено их необходимостью для выживания и развития инфекционного процесса в организме хозяина.

Предварительно проводили оптимизацию условий изотермической амплификации в диапазоне температур 60–67°C. Определили, что оптимальной температурой являлось 63°C, при которых скорость реакции оптимальна.

Диагностика штаммов патогенных листерий с помощью LAMP показала, что совместное использование выбранных наборов праймеров к генам *prfA* и *iap* обеспечивало выявление всех 37 исследованных штаммов *L. monocytogenes* и отсутствие взаимодействия с непатогенными листериями и гетерологичными бактериальными штаммами (табл. 2). При этом инклюзивность отдельных наборов Lm-iap и LM-prfa составляла 89,19 и 94,59% соответственно (табл. 3). Однако профиль выявления штаммов патогенных листерий для наборов праймеров не пересекался. Таким образом, использование смеси наборов праймеров обеспечивал амплификацию целевых генов минимум одним из них.

Гель-электрофоретический анализ демонстрировал характерный рисунок в виде лестницы, сформированный ампликонами ДНК различной длины (рис. 3, 4).

При использовании интеркалирующего красителя SYTO-82 определили продукты амплификации непосредственно

Таблица 3. Результаты определения инклюзивности и эксклюзивности наборов праймеров Lm-iap и LM-prfa
 Table 3. Results of determining the inclusivity and exclusivity of the Lm-iap and LM-prfa primer sets

	Lm-iap	LM-prfa	Lm-iap + LM-prfa
Число достоверно положительных результатов / The number of reliably positive results	33/37	35/37	37/37
Инклюзивность / Inclusivity	89,19%	94,59%	100%
Число достоверно отрицательных результатов / The number of reliably negative results	21/21	21/21	21/21
Эксклюзивность / Exclusivity	100%	100%	100%

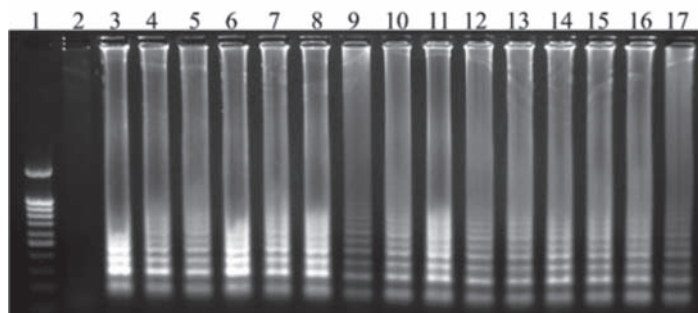


Рис. 3. Гель-электрофорез продуктов амплификации смеси наборов праймеров Lm-prfa и Lm-iap.

1 – маркеры молекулярного веса (100–10 000 п.н.) «СибЭнзим» (Россия), 2 – отрицательный контроль, 3 – *L. monocytogenes* 12ИП, 4 – *L. monocytogenes* 13ИП, 5 – *L. monocytogenes* 46ИП, 6 – *L. monocytogenes* 61ИП, 7 – *L. monocytogenes* EGD-е, 8 – *L. monocytogenes* NCTC10527, 9 – *L. monocytogenes* NCTC11994, 10 – *L. monocytogenes* NCTC7973, 11 – *L. monocytogenes* 766ИП, 12 – *L. monocytogenes* C664, 13 – *L. monocytogenes* M-1, 14 – *L. monocytogenes* M-2, 15 – *L. monocytogenes* M-5, 16 – *L. monocytogenes* 4908, 17 – *L. monocytogenes* Тв2016/2.

Fig. 3. Gel electrophoresis of amplification products of a mixture of primer sets Lm-prfa and Lm-iap.

1 – molecular weight marker (100–10 000 p.p.) СибЭнзим (Russia), 2 – отрицательный контроль, 3 – *L. monocytogenes* 12ИП, 4 – *L. monocytogenes* 13ИП, 5 – *L. monocytogenes* 46ИП, 6 – *L. monocytogenes* 61ИП, 7 – *L. monocytogenes* EGD-е, 8 – *L. monocytogenes* NCTC10527, 9 – *L. monocytogenes* NCTC11994, 10 – *L. monocytogenes* NCTC7973, 11 – *L. monocytogenes* 766ИП, 12 – *L. monocytogenes* C664, 13 – *L. monocytogenes* M-1, 14 – *L. monocytogenes* M-2, 15 – *L. monocytogenes* M-5, 16 – *L. monocytogenes* 4908, 17 – *L. monocytogenes* Тв2016/2.

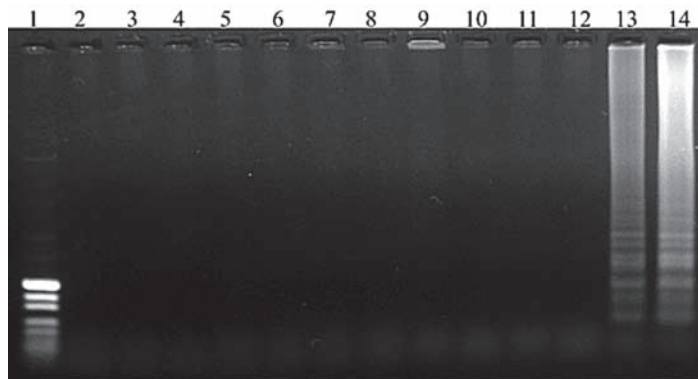


Рис. 4. Гель-электрофорез продуктов амплификации LAMP с набором праймеров Lm-iap для патогенных и непатогенных листерий, гетерологичных штаммов.

1 – маркеры молекулярного веса (100–1000 п.н.) «СибЭнзим» (Россия), 2 – отрицательный контроль, 3 – *B. cereus* ATCC14579, 4 – *S. enteritidis* ATCC14028, 5 – *S. aureus* ATCC6538, 6 – *E. coli* O157 ATCC43888, 7 – *L. innocua* NCTC11288, 8 – *L. ivanovii* ATCC19119, 9 – *L. seeligeri* SLCC3954, 10 – *L. welshimeri* 47ИП, 11 – *L. grayi* ATCC25401, 12 – *L. monocytogenes* NCTC11994, 13 – *L. monocytogenes* 12 ИП, 14 – *L. monocytogenes* ATCC7644.

Fig. 4. Gel electrophoresis of LAMP amplification products with a set of Lm-iap primers for pathogenic and non-pathogenic listeria, heterologous strains.

1 – molecular weight markers (100–1000 p.p.) СибЭнзим (Russia), 2 – negative control, 3 – *B. cereus* ATCC14579, 4 – *S. enteritidis* ATCC14028, 5 – *S. aureus* ATCC6538, 6 – *E. coli* O157 ATCC43888, 7 – *L. innocua* NCTC11288, 8 – *L. ivanovii* ATCC19119, 9 – *L. seeligeri* SLCC3954, 10 – *L. welshimeri* 47ИП, 11 – *L. grayi* ATCC25401, 12 – *L. monocytogenes* NCTC11994, 13 – *L. monocytogenes* 12 ИП, 14 – *L. monocytogenes* ATCC7644.

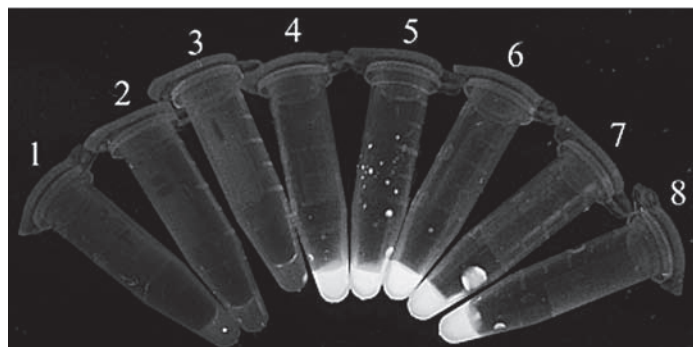


Рис. 5. Свечение интеркалирующего красителя SYTO-82 под УФ-облучением трансиллюминатора, 75% мощности. 1 – *L. seeligeri* SLCC3954, 2 – *L. ivanovii* ATCC19119, 3 – отрицательный контроль, 4 – *L. monocytogenes* NCTC11994, 5 – *L. monocytogenes* 12 ИП, 6 – *L. monocytogenes* ATCC7644, 7 – *L. monocytogenes* C664, 8 – *L. monocytogenes* Тв2016/2.

Fig. 5. Luminescence of SYTO-82 intercalating dye under UV irradiation of a transilluminator, 75% power. 1 – *L. seeligeri* SLCC3954, 2 – *L. ivanovii* ATCC19119, 3 – отрицательный контроль, 4 – *L. monocytogenes* NCTC11994, 5 – *L. monocytogenes* 12 ИП, 6 – *L. monocytogenes* ATCC7644, 7 – *L. monocytogenes* C664, 8 – *L. monocytogenes* Тв2016/2.

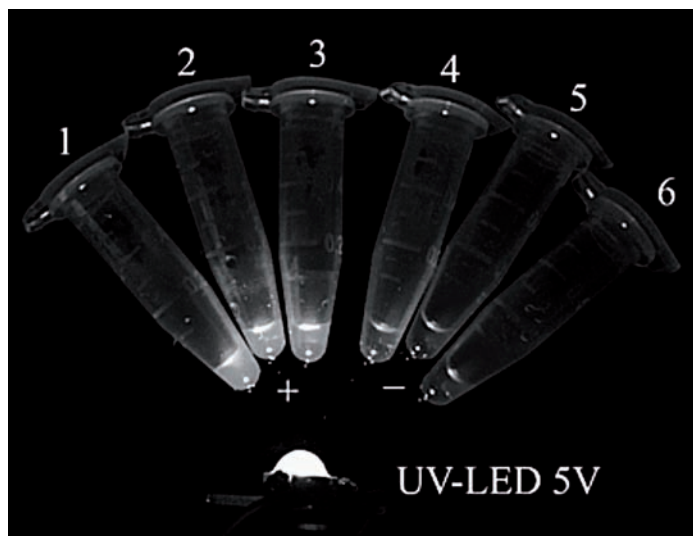


Рис. 6. Облучение продуктов амплификации LED-источником ближнего УФ-излучения. 1 – *L. monocytogenes* 12ИП, 2 – *L. monocytogenes* ATCC7644, 3 – *L. monocytogenes* NCTC11994, 4 – отрицательный контроль, 5 – *L. ivanovii* ATCC19119, 6 – *L. seeligeri* SLCC3954.

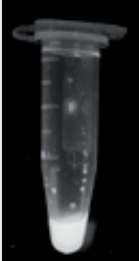
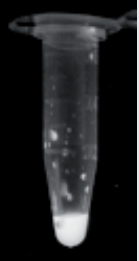





Fig. 6. Irradiation of the products of amplification with a near-UV LED source. 1 – *L. monocytogenes* 12ИП, 2 – *L. monocytogenes* ATCC7644, 3 – *L. monocytogenes* NCTC11994, 4 – negative control, 5 – *L. ivanovii* ATCC19119, 6 – *L. seeligeri* SLCC3954.

после изотермической амплификации при облучении УФ-светом (рис. 5).

Облучение микропробирок с продуктами реакции UV-LED источником ближнего УФ-света, запитанного от портативной 5В батареи, также позволило достоверно выявить положительные образцы (рис. 6).

Проверка чувствительности предложенного набора праймеров Lm-iap и LM-prfa с использованием интеркалирующего красителя SYTO-82 в качестве репортера показала возможность выявления ДНК патогенных листерий вплоть до концентрации $1,7 \cdot 10^1$ КОЕ/мл (табл. 4).

Таблица 4. **Определение предела чувствительности набора праймеров в LAMP с помощью интеркалирующего красителя SYTO-82**
Table 4. **Determination of the sensitivity limit of a primer set in LAMP using the SYTO-82 intercalation dye**

Количество бактерий, КОЕ/мл / <i>Bacteria count, CFU/ml</i>	1,7•10 ⁵	1,7•10 ⁴	1,7•10 ³	1,7•10 ²	1,7•10 ¹	1,7•10 ⁰	
Результат LAMP / <i>Result of LAMP</i>							

Применение дуплексного подхода при диагностике патогенных листерий методом изотермической амплификации позволило выявить все исследованные штаммы, в то время как индивидуальное использование наборов праймеров не давало необходимой инклюзивности. В результате возможно предположить, что использованный подход является более информативным для диагностики *L. monocytogenes*.

Простота реализации и экспрессность, визуальная качественная регистрация позволяют использовать изотермическую амплификацию в качестве внелабораторного метода анализа.

Заключение

В данной работе изучена возможность применения петлевой изотермической амплификации LAMP в качестве дополнения к стандартным методам диагностики патогенных листерий.

В результате тестирования панели штаммов *L. monocytogenes*, а также гетерологичных бактериальных штаммов с помощью предложенного набора праймеров для LAMP была показана возможность использования смеси праймеров для специфической диагностики патогенных листерий. Чувствительность метода составляла 1,7•10¹ КОЕ/мл. Продемонстрирована возможность получения 100%-й инклюзивности при условии сохранения специфичности диагностики. Кроме того, уменьшается время проведения диагностики по сравнению с культуральным методом и не требуется дорогостоящее оборудование.

В доступной литературе сведений, свидетельствующих об использовании предложенных наборов праймеров, не обнаружено.

Полученные данные позволяют использовать предложенную методику для проведения ускоренной диагностики патогенных листерий в условиях ограниченного технического оснащения лабораторий.

В настоящее время изотермическая амплификация нашла применение в диагностике различных патогенных микроорганизмов и вирусов. Разработка и совершенствование LAMP для диагностики патогенных листерий открывает широкие перспективы для тестирования бактерий в пищевых продуктах.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках Государственного задания по НИОКР 1.1.13

Funding information

The work was carried out within the framework of the State R&D assignment 1.1.13

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. The Lancet Gastroenterology Hepatology. Food safety really is everyone's business. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2019 Aug;4(8):571. DOI: 10.1016/S2468-1253(19)30202-X
2. Goulet V, King LA, Vaillant V, de Valk H. What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infect Dis*. 2013 Jan 10;13:11. DOI: 10.1186/1471-2334-13-11
3. Buchanan RL, Gorris LGM, Hayman MM, Jackson TC, Whiting RC. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*. 2018;88:236-236. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.01.004
4. Liang JJ, He XY, Ye H. Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* with hydrocephalus and intracranial hemorrhage: A case report and review of the literature. *World J Clin Cases*. 2019 Feb 26;7(4):538-547. DOI: 10.12998/wjcc.v7.i4.538
5. De Noordhout CM, Devleeschauwer B, Angulo FJ, Verbeke G, Haagsma J, Kirk M, Havelaar A, Speybroeck N. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2014 Nov;14(11):1073-1082. DOI: 10.1016/S1473-3099(14)70870-9
6. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов «Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы СанПиН 2.3.2.1078-01». 2002. / *Gigienicheskie trebovaniya bezопасnosti i pishchevoi tsennosti pishchevykh produktov «Sanitarno-epidemiologicheskie pravila i normativy SanPiN 2.3.2.1078-01»*. 2002. (In Russian).
7. Gill P, Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008 Mar;27(3):224-43. DOI: 10.1080/15257770701845204
8. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000 Jun 15;28(12):E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63
9. Burdino E, Calleri G, Ghisetti V. Added value of loop-mediated isothermal amplification technology (LAMP) in real life for the diagnosis of malaria in travellers. *J Travel Med*. 2019 Oct 14;26(7):taz052. DOI: 10.1093/jtm/taz052
10. Shchit IY, Ignatov KB, Kudryavtseva TY, Shishkova NA, Mironova RI, Marinin LI, et al. The use of loop-mediated isothermal DNA amplification for the detection

- and identification of the anthrax pathogen. *Mol Gen Microbiol ViroL*. 2017; 32(2):100-108. DOI: 10.3103/S0891416817020094
11. Curtis KA, Rudolph DL, Owen SM. Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J Virol Methods*. 2008 Aug;151(2):264-270. DOI: 10.1016/j.jviromet.2008.04.011
12. Hardinge P, Kiddle G, Tisi L, Murray JAH. Optimised LAMP allows single copy detection of 35Sp and NOST in transgenic maize using Bioluminescent Assay in Real Time (BART). *Sci Rep*. 2018 Dec 4;8(1):17590. DOI: 10.1038/s41598-018-36207-4
13. Watthanapanituck K, Kiatpathomchai W, Chu E, Panvisavas N. Identification of human DNA in forensic evidence by loop-mediated isothermal amplification combined with a colorimetric gold nanoparticle hybridization probe. *Int J Legal Med*. 2014 Nov;128(6):923-31. DOI: 10.1007/s00414-014-1018-9
14. Zhan LZ, Song DF, Gu Q, Yan TT, Ma CC. Reverse transcription – loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of pathogenic *Listeria monocytogenes* in meat products. *Can J Microbiol*. 2019 Dec;65(12):913-921. DOI: 10.1139/cjm-2019-0114
15. Tang MJ, Zhou S, Zhang XY, Pu JH, Ge QL, Tang XJ, Gao YS. Rapid and sensitive detection of *Listeria monocytogenes* by loop-mediated isothermal amplification. *Curr Microbiol*. 2011 Dec;63(6):511-6. DOI: 10.1007/s00284-011-0013-3
16. Cho A-R, Dong H-J, Seo K-H, Cho S. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *Listeria monocytogenes prfA* in milk. *Food Science and Biotechnology*. 2014;23(2):467-474. DOI: 10.1007/s10068-014-0064-x
17. Nathaniel BR, Ghai M, Druce M, Maharaj I, Olaniran AO. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay targeting *Imo0753* gene for detection of *Listeria monocytogenes* in wastewater. *Lett Appl Microbiol*. 2019 Oct;69(4):264-270. DOI: 10.1111/lam.13200
18. Liu Z, Zhu J, Xia X, Wang L, Yang C, Li X. Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay Based on *Imo0460* Sequence for Detection of *Listeria monocytogenes*. *J of Food Safety*. 2015;35(3):362-369. DOI: 10.1111/jfs.12183
19. Faith NG, Kathariou S, Neudeck BL, Luchansky JB, Czuprynski CJ. A P60 mutant of *Listeria monocytogenes* is impaired in its ability to cause infection in intragastrically inoculated mice. *Microb Pathog*. 2007 May-Jun;42(5-6):237-41. DOI: 10.1016/j.micpath.2007.01.004

Информация о соавторах:

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

Борзенков Валерий Николаевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии 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

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

Information about co-authors:

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

Valery N. Borzenkov, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Antimicrobial Drugs, Department of Molecular Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

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

Sergey S. Vetchinin, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of the Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

НОВОСТИ НАУКИ

Методы искусственного интеллекта, используемые для получения моделей устойчивости к антибиотикам

Устойчивость к антибиотикам представляет собой растущую медицинскую проблему, поскольку необработанные наборы клинических данных недостаточно используются в качестве средства отслеживания масштаба проблемы. Исследователи искали закономерности устойчивости к антибиотикам в базе данных «Лидерство и надзор за антимикробными испытаниями» (ATLAS). ATLAS содержит 6,5 млн минимальных ингибирующих концентраций (МИК) для 3919 пар патоген-антибиотик, выделенных у 633 тыс. пациентов в 70 странах в период с 2004 по 2017 год. Искали аномалии в данных, при которых МИК могли смещаться по методологическим, а не клиническим или микробиологическим причинам, и обнаружили артефакты в более чем 100 парах патоген-антибиотик. Используя информационно-оптимальную методологию кластеризации для классификации патогенов на группы с низкой и высокой чувствительностью к антибиотикам, ATLAS был использован для прогнозирования изменений устойчивости. Динамика последних демонстрирует сложные закономерности с повышением МИК и некоторым снижением, в результате чего МИК субпопуляций могут расходиться. Мы также идентифицируем патогены с риском развития клинической резистентности в ближайшем будущем.



Catalán P, Wood E, Blair JMA, et al.

Seeking patterns of antibiotic resistance in ATLAS, an open, raw MIC database with patient metadata. *Nat Commun*. 2022 May 25;13(1):2917. DOI: 10.1038/s41467-022-30635-7

Алгоритм разработки и характеристика диагностических латексных тест-систем, производимых в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии (часть 2)

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

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

В настоящей статье представлены данные о разработке и характеристике латексных диагностикумов для детекции и идентификации основных возбудителей пищевых инфекций – *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *E. coli* O104:H4, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, а также возбудителя нозокомиальных инфекций *Clostridioides difficile*. Показано, что разработанные диагностикумы обладают высокой чувствительностью и специфичностью (95–100%). Диагностикумы для идентификации *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 и *E. coli* O104:H4 зарегистрированы в Российской Федерации. Нормативно-техническая документация на производство остальных латексных диагностикумов утверждена директором ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии»; эти диагностикумы могут использоваться учреждениями Роспотребнадзора для санитарно-микробиологического контроля пищевых продуктов и объектов внешней среды.
Ключевые слова: реакция латекс-агглютинации, латексные частицы, антигены-мишени, сенсibilизация, чувствительность, специфичность

Для цитирования: Светоч Э.А., Ерусланов Б.В., Мицевич И.П., Храмов М.В., Перескокова Е.С., Карцев Н.Н., Фурсова Н.К. Алгоритм разработки и характеристика диагностических латексных тест-систем, производимых в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии (часть 2). Бактериология. 2023; 8(3): 56–67. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-56-67

The algorithm for development and characterization of diagnostic latex test-systems producing at the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology (part 2)

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

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

This article presents the data concerning the development and characterization of latex assays for the detection and identification of the main foodborne pathogens – *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *E. coli* O104:H4, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, as well as the nosocomial pathogen *Clostridioides difficile*. It was shown that the assays characterized in high level of sensitivity and specificity (95–100%). The assays for identification of *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 and *E. coli* O104:H4 were registered in the Russian Federation. Regulatory and technical documentation for the production of the remaining latex assays has been approved by the director of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology; these diagnostics can be used by Rosпотребнадзор institutions for sanitary-microbiological control of food products and environmental objects.
Key words: latex-agglutination, latex particles, antigen-targets, sensitization, sensitivity, specificity

For citation: Svetoch E.A., Eruslanov B.V., Mitsevich I.P., Khramov M.V., Pereskokova E.S., Kartsev N.N., Fursova N.K. The algorithm for development and characterization of diagnostic latex test-systems producing at the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology (part 2). Bacteriology. 2023; 8(3): 56–67. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-56-67

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: (4967) 360-079

Статья поступила 31.08.2023, принята к печати 29.09.2023

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 Rosпотребнадзор

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (496) 360-079

The article was received 31.08.2023, accepted for publication 29.09.2023

Большинство спорадических и вспышечных случаев пищевых инфекций в Российской Федерации (РФ) вызывают бактерии видов *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Campylobacter jejuni* и *Campylobacter coli*. Опасным возбудителем госпитальных инфекций, сопровождающихся у пациентов диареей и интоксикацией, является анаэроб *Clostridioides difficile*. В данной работе, кроме данных о разработке и характеристиках латексных тест-систем и их месте в диагностике пищевых инфекций, авторы дают краткие сведения о перечисленных выше возбудителях и вызываемых ими инфекциях. Следует отметить, что для приготовления описываемых диагностикумов во всех случаях были использованы коммерческие латексные сферы диаметром 0,8 мкм, активированные либо карбоксильными группами, либо стрептавидином. Латексные диагностикумы разрабатывали в соответствии с предложенным авторами алгоритмом, включающим выбор антигенамишени, выделение и хроматографическую очистку антигена, получение специфических IgG-антител, сенсибилизацию латексных частиц специфическими IgG-антителами, оценку чувствительности и специфичности полученных латексных диагностикумов.

Латексный диагностикум для быстрой идентификации *L. monocytogenes* (Латексная тест-система *L. monocytogenes*) по ТУ 9398–147–78095326–2012, Рег. № РЗН 2013/1304

Листериоз – инфекционное заболевание человека и многих видов животных, включая домашних (кошки и собаки) и сельскохозяйственных (крупный рогатый скот, овцы, козы, свиньи, кролики и др.). Возбудитель инфекции *L. monocytogenes* принадлежит к роду *Listeria*, который помимо *L. monocytogenes* включает еще пять видов – *L. ivanovi*, *L. welshimerri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* и *L. innocua*. Однако заболевание у человека вызывает только *L. monocytogenes*. У животных, кроме *L. monocytogenes*, листериоз вызывают бактерии вида *L. ivanovi* [1, 2].

L. monocytogenes – грамположительные неспорообразующие палочковидные бактерии длиной 1–2 мкм, широко распространенные в природе. Биологическая особенность листерий – высокая устойчивость к экстремальным факторам внешней среды: температуре, колебаниям pH от 4,1 до 9,6 и высоким концентрациям солей (10%). Листерии – психрофилы, они способны расти и размножаться в интервале температур от 1 до 45°C [3]. На сегодняшний день у *L. monocytogenes* известно 13 серотипов: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4ab и 7. Серотипы 1/2a, 1/2b, 4 и 4b являются причиной 98% вспышечных случаев листериоза, причем наиболее вирулентным считают серотип 4b. Основным резервуаром и источником листерий в природе являются грызуны, сельскохозяйственные животные, промышленная птица. *L. monocytogenes* встречаются в почве, сточных водах, на растениях и т.д. [4].

Люди заражаются *L. monocytogenes* главным образом при употреблении контаминированных патогеном продуктов питания – мясных изделий, рыбы, сырого молока, сыра, растительных салатов, фруктов и др. Можно заразиться также при контакте с больными листериозом пациентами и инфицированными животными.

Заражающая доза *L. monocytogenes* для человека, в зависимости от состояния его иммунной системы и вирулентности штамма, может составлять от 10² до 10⁶ КОЕ. Инкубационный период заболевания колеблется от 6 ч до 30 суток [3]. *L. monocytogenes* вызывает три формы заболевания: желудочно-кишечную, системную и неонатальную. Желудочно-кишечная форма листериоза возникает у людей после употребления ими с пищей больших доз патогена (10⁶–10⁸ КОЕ); инкубационный период при этой форме болезни, как правило, составляет <24 ч. Основные симптомы болезни – гастроэнтерит, повышенная температура, головная боль, тошнота, боль в животе, рвота и водянистая диарея. Лечение – этиотропное и симптоматическое [5]. Системный листериоз, сопровождающийся высокой летальностью (до 30%), поражает чаще всего людей с ослабленным иммунитетом – детей, пожилых людей, беременных женщин, больных СПИДом, онкологических больных и др. У таких лиц *L. monocytogenes* после колонизации кишечника проникает в кровеносную и лимфатическую системы, концентрируясь в основном в печени и селезенке. Далее, после короткого периода бактериемии, возбудитель может преодолеть гематоэнцефалический барьер и вызвать опасные для жизни менингит и энцефалит. У беременных женщин патоген может инфицировать плод. Клинические симптомы системного листериоза – общее болезненное состояние, повышенная температура, головная боль; у больного могут развиваться менингит, энцефалит, атаксия, бактериемия, сепсис; в печени может появиться абсцесс [6]. При неонатальном листериозе *L. monocytogenes* проникают в плаценту, активно в ней размножаются, инфицируют плод, вызывая зачастую его гибель. В результате могут наступить преждевременные роды, рождается инфицированный или мертвый ребенок. Симптомы неонатального листериоза: в начале болезни гриппоподобное состояние, переходящее в тяжелую головную боль, далее – снижение двигательной активности плода и преждевременные роды. У больной могут развиваться пневмония, одышка, повышенная возбудимость, рвота, судороги, низкая или очень высокая температура. Смертность при неонатальном листериозе составляет около 36% [7].

Для диагностики листериозной инфекции у человека и обнаружения *L. monocytogenes* в пищевых продуктах используют микробиологические, иммунологические, молекулярно-генетические и биофизические методы. Микробиологический (культуральный) метод предполагает выделение культуры возбудителя на дифференциально-диагностических средах и последующую ее идентификацию. Этот метод требует много средств и времени, тем не менее выделение чистой культуры *L. monocytogenes* из клинического материала и пищевых продуктов является, пожалуй, единственным критерием для постановки диагноза у больного и для заключения об инфицировании продуктов питания патогеном. Изучение фено- и генотипических свойств выделенных культур *L. monocytogenes* позволяет охарактеризовать их патогенный потенциал, определить чувствительность к антимикробным препаратам, выявить источник инфекции и оценить эпидемическую ситуацию по листериозной инфекции [8]. Помимо культуральных тестов, используют также серологические методы (постановку реакции агглютинации (РА) со

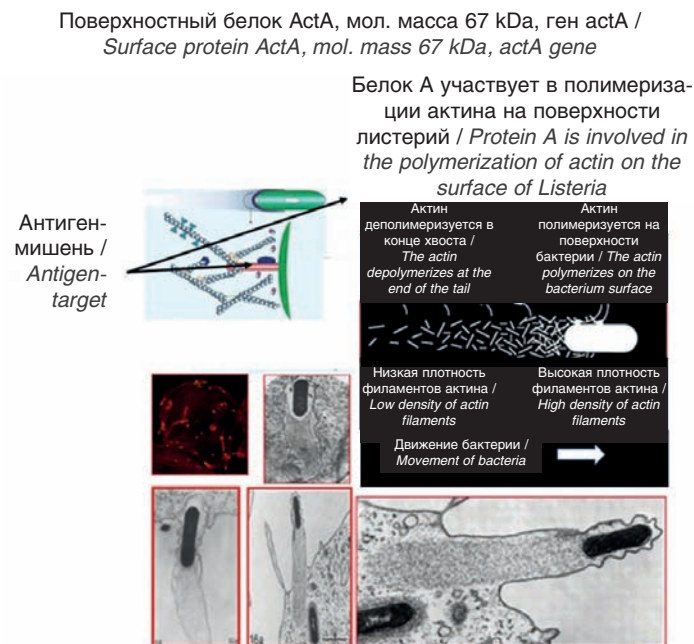


Рис. 1. Антиген-мишень *L. monocytogenes* – поверхностный белок ActA [11].
Fig. 1. The target antigen of *L. monocytogenes* – the surface protein ActA [11].

специфической сывороткой, реакцию латекс-агглютинации (РЛА) и молекулярно-генетические (анализ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)), а также масс-спектрометрический анализ с помощью технологии MALDI-TOF MS [9]. Из числа перечисленных методов с целью поиска и отбора изолятов *L. monocytogenes* среди колоний, выросших на дифференциально-диагностических средах, после первичного посева клинического материала или пищевых продуктов, целесообразнее всего, на наш взгляд, использовать РЛА как наиболее простую и быстро выполняемую. Особенно полезна РЛА для контроля *L. monocytogenes* при анализе большого количества образцов пищевых продуктов.

Разработку латексного диагностикума для быстрой идентификации *L. monocytogenes* проводили в соответствии с предложенным нами алгоритмом [9]. В качестве антигена-мишени был выбран уникальный, встречающийся только у бактерий вида *L. monocytogenes*, расположенный на поверхности клеточной стенки, трехдоменный белок полимеризации актина ActA (молекулярная масса 67 kDa, 639 аминокислотных остатков). Образуемый этим белком «актиновый хвост» способствует перемещению патогена в цитоплазме хозяйской эукариотической клетки и проникновению возбудителя из клетки в клетку (рис. 1) [10]. Как показали наши исследования, белок ActA имеет хорошие иммуногенные свойства, что позволяет получить высокотитражные специфические анти-ActA IgG-антитела. Такую сыворотку получали 6-кратной иммунизацией кроликов подкожно (п/к) и внутривенно (в/в) взвесью убитых нагреванием клеток *L. monocytogenes*. Латексный диагностикум получали на основе латексных частиц, активированных карбоксильными группами, при этом на латексных частицах происходило прикрепление (сенсбилизация) анти-ActA-антител за счет пептидной связи. Полученный диагностикум обла-

дал 100%-й чувствительностью (положительная РЛА с 50 индикаторными штаммами *L. monocytogenes*, выделенными от людей ($n = 35$), птицы ($n = 7$) и из пищевых продуктов ($n = 8$). Специфичность диагностикума также была высока: ни один из штаммов *L. innocua* ($n = 5$), *L. seeligeri* ($n = 5$), *L. grayi* ($n = 3$), *L. ivanovii* ($n = 1$) и *L. welshimeri* ($n = 2$) не давал положительных результатов в РЛА с разработанным диагностикумом.

Латексный диагностикум для быстрой идентификации *E. coli* O157:H7 (латексная тест-система *E. coli* O157:H7) по ТУ9388 – 154 – 7809532 – 2013. Рег. № РЗН 2015/3027

Энтерогеморрагические шигатоксин-продуцирующие *E. coli* (STEC) штаммы серотипа O157:H7 на сегодняшний день являются основными возбудителями тяжелой формы пищевой инфекции – геморрагического колита (ГК) и нередко сопровождающего его гемолитико-уремического синдрома (ГУС), опасного для жизни человека. Приблизительно 50% случаев ГК и ГУС вызывают именно *E. coli* O157:H7. Инфекция распространена во многих странах мира, включая РФ [12]. ГК проявляется у больных кровавым поносом, тромбоцитопенией, гемолитической анемией, поражением толстого кишечника и центральной нервной системы [13]. При ГУС у больных поражаются почки и развивается почечная недостаточность. Лечение ГК и ГУС симптоматическое, этиотропная терапия противопоказана. Смертность при ГК и ГУС составляет $\geq 5\%$ [12]. Основным источником STEC-штаммов *E. coli* O157:H7 – сельскохозяйственные и дикие животные: крупный рогатый скот, овцы, козы, свиньи, лоси и др. Экологическая ниша возбудителя – толстый кишечник животных. Человек заражается возбудителем ГК при употреблении контаминированных *E. coli* O157:H7 мясных, молочных и растительных продуктов, а также воды, соков и др. [14]. Заражающая доза возбудителя – ≥ 100 клеток; инкубационный период инфекции – 2–3 дня. Регистрируют как спорадические случаи, так и эпидемические вспышки инфекции, поражающие десятки, сотни и тысячи человек. Наиболее опасны ГК и ГУС для детей возраста до 5 лет и для лиц пожилого возраста [15].

E. coli O157:H7 – грамотрицательные, неспорообразующие, подвижные палочки длиной 1–3 мкм; факультативные анаэробы, непритворливые к питательным средам; оптимальная температура роста – 37°C. На плотных питательных средах образуются типичные для *E. coli* колонии S-формы. Ферментативная особенность *E. coli* O157:H7 – неспособность сбраживать сорбитол. Энтерогеморрагические штаммы *E. coli* O157:H7 продуцируют шигатоксины 1-го и 2-го типов (Stx1 и Stx2), а также энтерогемолизин и белок адгезии интимин. Доставка эффекторных белков (факторов вирулентности) *E. coli* O157:H7 в эукариотическую клетку осуществляется через систему секреции III типа («молекулярную иглу») [16].

При подозрении на ГК и ГУС очень важно выделить и охарактеризовать культуру возбудителя: определить принадлежность ее к серогруппе и способность продуцировать шигатоксины. Для поиска и идентификации колоний *E. coli* O157:H7 среди колоний *E. coli*, выросших на дифференциально-диагностической среде после первичного посева исследуемого материала, используют обычную РА, РЛА, имму-

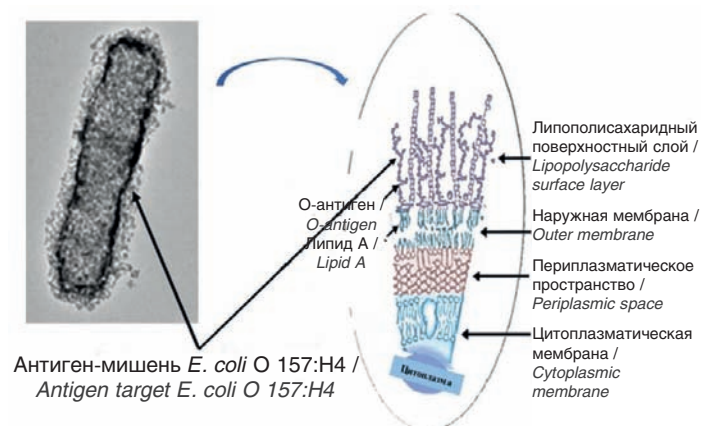


Рис. 2. Антигенная структура внешней мембраны *E. coli* O157:H7 [18].
Fig. 2. Antigenic structure of the outer membrane of *E. coli* O157:H7 [18].

нохроматографические (ИХ) тесты или ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). С помощью РА и РЛА определяют принадлежность культуры к серогруппе *E. coli* O157, с помощью ИХ-тестов и ПЦР-РВ – способность штамма продуцировать шигатоксины [17].

Разработку латексного диагностикума для экспресс-индикации *E. coli* серогруппы O157 выполняли в соответствии с предложенным нами алгоритмом. В качестве антигена-мишени был выбран О-антиген (полисахаридный компонент липополисахарида *E. coli* O157:H7), определяющий специфичность серогруппы *E. coli* O157 (рис. 2). Многократная подкожная и внутривенная иммунизация кроликов инактивированной нагреванием взвесью *E. coli* O157:H7 позволила получить препарат высокотитражных (1:320 в РДП) специфических IgG-антител. Выделенными IgG-антителами сенсibiliзировали латексные частицы, активированные карбоксильными группами (получение диагностикума).

Чувствительность приготовленного диагностикума (сенсibiliзированные IgG-антителами латексные частицы) была испытана на 69 штаммах *E. coli* O157:H7, выделенных от больных ГК и ГУС в 2002–2018 гг. в разных регионах РФ, а также полученных из Японии и референс-лаборатории ЕС (Рим, Италия). Кроме того, чувствительность латексного диагностикума была проверена на 74 штаммах *E. coli* O157:H7, изолированных в 1999–2010 гг. в шести областях РФ от сельскохозяйственных животных: крупного рогатого скота, свиней и птицы. Все использованные штаммы *E. coli* O157:H7, выделенные от людей и животных, дали положительную реакцию латекс-агглютинации на стекле с разработанным диагностикумом, т.е. диагностикум обладал 100%-й чувствительностью. Специфичность латексной тест-системы *E. coli* O157:H7 была испытана на штаммах *E. coli* гетерологичных серотипов, выделенных от людей с клиникой острой кишечной инфекции (ОКИ) ($n = 35$) и от животных ($n = 15$), а также на штаммах *Shigella* spp., *Salmonella* spp. и *Citrobacter* spp. Из числа изученных гетерологичных штаммов *E. coli* три дали положительную РЛА с испытуемым диагностикумом: один штамм был выделен от человека с ОКИ, два других – от птицы, т.е. специфичность латексного диагностикума *E. coli* O157:H7 составила 97%. Таким образом, разработанная нами латексная тест-система для идентификации *E. coli*

O157:H7 по своей чувствительности и специфичности сопоставима с аналогичными зарубежными тест-системами.

Латексный диагностикум для быстрой идентификации шигатоксин-продуцирующих *E. coli* O104:H4 по ТУ9388 – 153 – 7809532 – 2013. Рег. № РЗН 2015/3035

Шига-токсин продуцирующие *E. coli* серотипа O104:H4 – это новый, недавно выявленный, гибридный, резистентный ко многим антибиотикам, высоковирулентный и опасный для человека возбудитель ГК и ГУС. В 2011 г. *E. coli* O104:H4 вызвали в Германии крупную эпидемическую вспышку пищевой инфекции, поразившую более 4000 человек. Вспышка сопровождалась развитием у многих больных тяжелой формы ГУС, приведшим к гибели 54 человек. Заразились люди при употреблении контаминированной патогеном растительной пищи (проросшие зерна пажитника). По структуре генома *E. coli* O104:H4 относятся к энтероагрегативному патотипу, получившему вместе с умеренным бактериофагом ген *stx2*, кодирующий синтез шигатоксина 2-го типа [19].

Диагностика ГК, вызванного *E. coli* O104:H4, серьезно затруднена, поскольку патоген не имеет каких-либо культурально-морфологических или биохимических маркеров, отличающих его от непатогенных *E. coli*. Поэтому поиск и идентификация колоний этого серотипа возможна с помощью иммунологических (постановка РЛА и иммуноферментного анализа (ИФА)) и молекулярно-генетических (ПЦР-РВ) методов [20]. Для поиска и отбора колоний *E. coli* O104:H4, выросших на среде после посева клинического материала, целесообразнее всего использовать РЛА.

Алгоритм разработки латексного диагностикума для идентификации *E. coli* серогруппы O104 был аналогичным используемому нами алгоритму получения латексного диагностикума для определения *E. coli* серогруппы O157, за исключением одного: в качестве антигена-мишени использовали полисахаридный компонент (О-антиген) липополисахарида *E. coli* серогруппы O104 (рис. 3).

Чувствительность полученного латексного диагностикума была испытана, к сожалению, только на двух штаммах этой серогруппы: *E. coli* O104:H4 и O104:H11. Ограниченное количество штаммов этого серотипа объясняется отсутствием сведений о резервуаре и источнике этого опасного патогена,

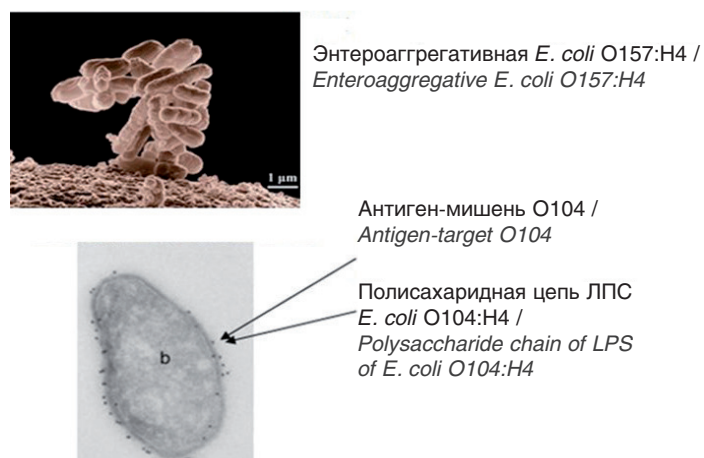


Рис. 3. Антиген-мишень *E. coli* O104:H4 [21].
Fig. 3. Target antigen of *E. coli* O104:H4 [21].

из которых можно было бы пополнить коллекцию штаммов серотипа *E. coli* O104:H4. В то же время разработанный диагностикум обладал 100%-й специфичностью: ни один из 50 индикаторных штаммов, принадлежащих к другим серогруппам *E. coli*, не дал положительной РЛА, предназначенной для идентификации *E. coli* O104:H4.

Латексный диагностикум для быстрой идентификации возбудителя кишечного иерсиниоза *Y. enterocolitica* в реакции латекс-агглютинации (Латексная тест-система *Y. enterocolitica*) по ТУ 21.20.23-342-78095326-2021 и латексный диагностикум для быстрой идентификации возбудителя псевдотуберкулеза *Y. pseudotuberculosis* в реакции латекс-агглютинации (Латексная тест-система *Y. pseudotuberculosis*) по ТУ 21.20.23-342-78095326-2021

В этиологической структуре пищевых инфекций определенное место занимают йерсиниозы, вызываемые бактериями двух видов: *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*. Заболевания, обусловленные *Y. enterocolitica*, регистрируют в разных странах намного чаще, чем *Y. pseudotuberculosis*-инфекцию.

Y. enterocolitica – не образующие спор бактерии, имеющие форму коротких палочек, при температуре 25°C экспрессирующие перитрихально расположенные на клетке жгутики (клетки подвижны), а при температуре 37°C не экспрессирующие жгутиков (клетки неподвижны). *Y. enterocolitica* – факультативные анаэробы, психрофилы, способные размножаться на пищевых продуктах при температуре от 1 до 44°C. На агаризованных средах с овечьей кровью и на среде Мак-Конки бактерии растут медленно: через 24 ч инкубирования на средах обнаруживают точечные колонии. *Y. enterocolitica* образуют сахарозу и не образуют ксилосу и лактозу. В зависимости от биологических свойств, экологического и географического распространения *Y. enterocolitica* подразделяют на пять биогрупп: 1А, 1В, 2, 3, 4 и 5. Изоляты биогрупп 1В, 2–5 могут вызывать заболевания человека. Показано, что в геноме йерсений этих биогрупп всегда присутствуют гены термостабильного энтеротоксина *ystA*. Штаммы биогруппы 1А, как правило, непатогенны для человека [22]. На сегодняшний день у *Y. enterocolitica* известно 34 серогруппы. Биогруппа 1А включает в себя серогруппы O5, O6, O3а, O7, O8, O18 и O46; биогруппа 1В – серогруппы O8, O4, O1, O3а, O18, O20 и O21; биогруппа 2 – серогруппы O9, O5 и 27; биогруппа 3 – серогруппы O1, O2, O3, O5 и O27; биогруппа 4 – серогруппу O3; биогруппа 5 – серогруппы O2 и O3. Как показывают эпидемиологические исследования, большинство случаев *Y. enterocolitica*-инфекций вызывается штаммами ограниченного числа серогрупп: O3, O8, O9, O5, O27 и O13 [23]. Показано также, что в разных странах доминирующие возбудители кишечного иерсиниоза принадлежат к разным серогруппам. Например, в европейских странах самыми распространенными серогруппами *Y. enterocolitica* являются O3 и O9 – на их долю приходится 90% всех случаев инфекции [24]. В Японии доминирующим патогеном являются йерсинии серогруппы O3, в то время как в США преобладают серогруппы O8, O3, O5 и O27. В РФ доминируют *Y. enterocolitica* серогруппы O3 [25]. У патогенных *Y. enterocolitica* идентифи-

цированы основные факторы вирулентности, гены которых локализованы либо на хромосоме, либо на плазмиде вирулентности *pYV* (plasmid of *Yersinia virulence*). Гены вирулентности контролируют адгезию и инвазию патогена, размножение в энтероцитах, макрофагах, лимфатических узлах, отвечают за устойчивость к бактерицидному действию сыворотки крови, за продукцию термостабильного энтеротоксина и за получение патогеном ионов железа. Гены вирулентности детерминируют важный для патогена белок адгезии *Yad*, а также белки III типа секреции и белок *Yop*, подавляющий секрецию цитокинов макрофагами. У непатогенных *Y. enterocolitica* плазмиды *pYV* отсутствует [26].

Y. enterocolitica – довольно широко распространенные в природе микроорганизмы, их обнаруживают в почве, воде, сточных водах, в содержимом кишечника грызунов, сельскохозяйственных и домашних животных (крупного рогатого скота, овец, коз, собак и кошек). Однако основным источником и носителем патогенных *Y. enterocolitica* являются свиньи. Обсеменение патогенными йерсиниями животных в отдельных стадах свиней может достигать 100% [27]. Человек чаще всего заражается кишечным иерсиниозом при употреблении контаминированных *Y. enterocolitica* воды и пищи, в которых патоген может накапливаться во время хранения. Инфицирующая доза патогена составляет 10⁷–10⁹ КОЕ. Болезнь развивается спустя 24–30 ч после приема зараженной пищи [28]. К кишечному иерсиниозу более восприимчивы дети, нежели взрослые. Основные клинические признаки болезни: острый энтерит, сильные боли в нижней части живота, напоминающие боли при аппендиците, диарея, тошнота, рвота и повышенная температура. У больного может развиваться энтероколит, мезентериальный лимфаденит и терминальный илеит. Симптомы болезни у детей могут проявляться в течение 28 дней, у взрослых – 1–2 нед. Летальные исходы весьма редки. Тяжелая форма болезни, характерная для лиц со сниженным иммунитетом, может сопровождаться септициемией, пиемией, менингитом, энцефалитом и закончиться летально. Лечение болезни этиотропное и симптоматическое [29].

Y. pseudotuberculosis – мелкие, длиной 1–3 мкм, шириной 0,5–0,8 мкм грамотрицательные палочки (или коккобактерии), не образующие спор и капсул. При температуре ниже 30°C бактерии подвижны (за счет образования перитрихально расположенных на клетке жгутиков), при 37°C жгутики не образуются (клетки неподвижны). Вид *Y. pseudotuberculosis*, в отличие от *Y. enterocolitica*, сравнительно биохимически однороден. *Y. pseudotuberculosis* растут на простых питательных средах, через 24 ч образуя прозрачные или полупрозрачные мелкие колонии диаметром 0,1–1,0 мм. На CIN-агаре (цефсулодин-иргасан-новобиоцин) через 48 ч выращивания при температуре 25–30°C колонии достигают 2 мм в диаметре. На агаре Мак-Конки через 24 ч роста при температуре 25–30°C йерсинии формируют точечные, до 1 мм в диаметре, плоские лактозонегативные колонии. *Y. pseudotuberculosis* – психрофилы, они способны довольно активно размножаться при низких температурах (от 0 до +4°C). Для патогена характерна также олиготрофность – для его роста и размножения достаточен минимум питательных веществ. Благодаря своей психрофильности и олиготрофности йерсинии могут накапливаться в воде, пищевых про-

дуктах или донорской крови, сохраняемых в условиях бытового холодильника [30].

Вирулентные штаммы возбудителя псевдотуберкулеза содержат плазмиду вирулентности pYV. В штаммах *Y. pseudotuberculosis* серогруппы O4, циркулирующих в РФ, часто обнаруживают плазмиду вирулентности pYV с молекулярной массой 82 МДа (pVM82). Показано, что наличие плазмиды pVM82 у возбудителя коррелирует с более тяжелым течением инфекции [31]. Основным природным резервуаром и источником бактерий *Y. pseudotuberculosis* являются грызуны, в т.ч. обитающие в овощехранилищах. *Y. pseudotuberculosis*, выделяемые грызунами, попадают на овощи (капуста, морковь, свекла, картофель и др.), где бактерии размножаются и накапливаются в значительных концентрациях. Использование контаминированных патогеном овощей для приготовления, например, салатов и их потребление может стать причиной заболевания человека псевдотуберкулезом [32]. Для больных псевдотуберкулезной инфекцией характерным являются выраженный полиморфизм клинических симптомов, отсутствие четких патогномичных признаков болезни, а также склонность к затяжному и хроническому течению. При псевдотуберкулезе часто отмечают лихорадку и боль в животе; диарея и рвота, как правило, у больного отсутствуют. У людей с ослабленным иммунитетом псевдотуберкулез может сопровождаться тяжелыми осложнениями: реактивным артритом, синдромом Рейтера, узловой эритемой и синдромом Кавасаки. Все эти осложнения возникают под действием суперантигена YPM, продуцируемого возбудителем псевдотуберкулеза [33].

Для обнаружения бактерий *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* в исследуемом материале используют культуральные, серологические и молекулярно-генетические методы. Культуральный метод обнаружения возбудителей обеих инфекций является золотым стандартом, поскольку он позволяет выделить чистую культуру патогена и изучить его фено- и генотипические свойства. Этот метод включает в себя селективное обогащение на жидких питательных средах, или холодное обогащение, и щелочную обработку; выделение чистой культуры на дифференциально-диагностических средах и идентификацию изолятов, используя для этого биохимические, иммунологические и молекулярно-генетические тесты [24]. Из иммунологических методов часто используют серологическое титрование изолятов йерсений с помощью РЛА на стекле, применяя для этого коммерческие IgG-антитела к наиболее распространенным серотипам *Y. enterocolitica* (O3, O5, O9 и O8) и *Y. pseudotuberculosis* (O1–O6) (Denka Seiken, Япония) [34].

Целью наших исследований была разработка латексных тест-систем для идентификации *Y. enterocolitica* серогруппы O3 и *Y. pseudotuberculosis* серогруппы O4, наиболее распространенных и эпидемиологически значимых в РФ и других странах. Диагностикумы разрабатывали согласно предложенному нами алгоритму. В качестве специфических антигенов-мишеней были выбраны полисахаридные компоненты (O-антигены) липополисахаридов серогруппы O3 *Y. enterocolitica* и серогруппы O4 *Y. pseudotuberculosis* (рис. 4). Гипериммунные сыворотки к антигенам-мишеням получали 6-кратной п/к и в/в иммунизацией кроликов убитыми нагреванием клетками *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* с

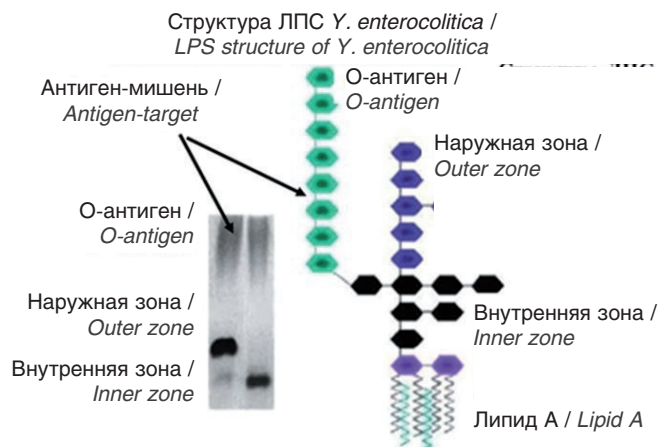


Рис. 4. Структура антигена-мишени (O-антигена) для идентификации *Y. enterocolitica* серогруппы O:3 [28].
Fig. 4. Structure of the target antigen (O antigen) for identifying *Y. enterocolitica* serogroup O:3 [28].

последующим выделением из сывороток специфических IgG-антител по методу, описанному нами в части 1 данного обзора [9].

Латексные частицы, активированные карбоксильными группами, сенсibilизировали специфическими IgG-антителами к O-антигенам *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* через пептидную связь. Как показали наши исследования, связанные с латексными частицами IgG-антитела через пептидную связь сохранялись на них (давали положительную РЛА) в течение одного года. Полученные в эксперименте сенсibilизированные латексные частицы (диагностикумы) имели 100%-ю чувствительность: каждый из диагностикумов давал положительную РЛА на стекле с соответствующими штаммами *Y. enterocolitica* серогруппы O3 ($n = 8$) и *Y. pseudotuberculosis* серогруппы O4 серогруппы ($n = 3$). Специфичность приготовленных диагностикумов испытывали в перекрестных реакциях на штаммах *Y. enterocolitica* ($n = 15$), *Y. pseudotuberculosis* ($n = 10$), а также на штаммах *L. monocytogenes* ($n = 50$), *Salmonella* spp. ($n = 47$), *Shigella* spp. ($n = 18$) и *E. coli* ($n = 55$). Специфичность латексной тест-системы *Y. enterocolitica* составила 96%, латексной тест-системы *Y. pseudotuberculosis* – 97%.

Научно-техническая документация на производство и использование латексных диагностикумов для идентификации *Y. enterocolitica* серогруппы O3 и *Y. pseudotuberculosis* серогруппы O4 утверждены руководителем ФБУН ГНЦ ПМ Б в 2021 г. Диагностикумы могут использоваться учреждениями Роспотребнадзора для санитарно-микробиологической оценки пищевых продуктов и объектов внешней среды.

Латексные диагностикумы для быстрой идентификации возбудителей шигеллёза *S. flexneri*, *S. sonnei* и *S. dysenteriae* (Латексная тест-система *Shigella*) по ТУ 21.20.23-349-78095326-202.

Шигеллез (дизентерия) – это инфекционное заболевание человека, вызываемое бактериями рода *Shigella*. Болезнь сопровождается, как правило, поражением дистального отдела толстого кишечника, нередко кровавым поносом и симптомами общей интоксикации. Шигеллез регистрируется во многих развитых и развивающихся странах, включая РФ. По данным Всемирной организации здравоохранения,

удельный вес шигеллеза в структуре ОКИ составляет от 54 до 75%; от дизентерии ежегодно в мире умирает около 1 млн человек [35, 36].

Род *Shigella* включает в себя четыре серогруппы: А, В, С и D. Серогруппа А объединяет 15 серотипов вида *S. dysenteriae*. Серогруппа В представлена видом *S. flexneri*, который насчитывает 6 серотипов. В серогруппу С входит вид *S. boydii*, состоящий из 19 серотипов. Серогруппа D включает в себя вид *S. sonnei*, имеющий один серотип [36]. Шигеллы – граммотрицательные, неподвижные, не образующие спор и капсул палочки длиной 1–3 мкм, шириной 0,5 мкм. Они хорошо растут на простых питательных средах и способны размножаться в пищевых продуктах (в молоке, салатах, вареных мясе и рыбе, компотах, киселях и др.). Культуры *S. dysenteriae*, *S. flexneri* и *S. boydii* имеют весьма схожие биохимические признаки, в то время как ферментативные свойства бактерий *S. sonnei* существенно отличаются по указанным свойствам от вышеназванных видов.

Восприимчивость людей к возбудителям дизентерии высокая, особенно чувствительны к шигеллезу дети возраста до 5 лет и лица с ослабленным иммунитетом. Инфицирующая доза при шигеллезе – 10–100 КОЕ. Источником инфекции являются больные шигеллезом пациенты с острой, хронической или субклинической формами болезни и люди-бактерионосители. Особую эпидемиологическую опасность представляют бактерионосители шигелл из числа работников питания и водоснабжения. Больные дизентерией с самого начала болезни, а иногда даже в инкубационный период, опасны для окружающих. Длительность выделения возбудителя больными в среднем составляет одну неделю, иногда выделение патогена может продолжаться до двух недель. Факторы передачи возбудителя – зараженная пища, вода, руки и другие объекты. В РФ и других странах основными возбудителями шигеллеза являются бактерии *S. flexneri* и *S. sonnei* [37].

Шигеллы имеют соматический термостабильный О-антиген и термолабильный К-антиген. Соматический О-антиген представляет собой полисахаридный компонент липополисахарида клеточной стенки шигелл. Этот антиген определяет видовую специфичность шигелл. К-антиген шигелл присутствует у *S. boydii* и *S. dysenteriae*, но отсутствует у *S. sonnei* и *S. flexneri* [38]. При подозрении на шигеллез очень важно выделить и охарактеризовать возбудитель: определить его вид, сиквенс-тип, чувствительность к антимикробным препаратам и другие свойства изолятов. Для поиска и идентификации возбудителей шигеллеза среди колоний, выросших на специальных дифференциально-диагностических средах после первичного посева исследуемого материала можно использовать РЛА, ИХ-тест и ПЦР-РВ [39]. Из числа перечисленных реакций, учитывая простоту и эффективность, наиболее приемлемой является РЛА.

Разработку латексных диагностикумов для экспресс-идентификации *S. flexneri*, *S. sonnei* и *S. dysenteriae* мы проводили, как и в других случаях, в соответствии с предложенным нами алгоритмом [9]. В качестве антигенов-мишеней были взяты О-антигены, определяющие видовую специфичность *S. flexneri*, *S. sonnei* и *S. dysenteriae*. В результате 6-кратной в/в и п/к иммунизации кроликов взвесью инактивированных нагреванием клеток указанных трех шигелл были получены

препараты высокотитражных (1:120–1:320 в РДП) специфичных IgG-антител. Латексные диагностикумы были приготовлены путем сенсibilизации латексных частиц, активированных карбоксильными группами, полученными IgG-антителами.

Как показали дальнейшие исследования, все три полученных диагностикума имели 100%-ю чувствительность: каждый из них давал положительную РЛА на стекле с соответствующими гомологичными штаммами *S. flexneri* ($n = 8$), *S. sonnei* ($n = 9$) и *S. dysenteriae* ($n = 1$), выделенными от людей и из пищевых продуктов. Специфичность приготовленных диагностикумов испытывали в перекрестных реакциях с *S. flexneri*, *S. sonnei* и *S. dysenteriae*, а также со штаммами *E. coli*, *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*. Специфичность латексных диагностикумов в отношении штаммов *S. flexneri*, *S. sonnei* и *S. dysenteriae* составила 97, 98 и 100% соответственно. Выпускаемая в ФБУН ГНЦ ПМБ «Латексная тест-система *Shigella*» может использоваться учреждениями Роспотребнадзора для санитарно-микробиологической оценки пищевых продуктов, воды и объектов окружающей среды.

Латексные диагностикумы для быстрой идентификации возбудителей кампилобактериоза *C. jejuni* и *C. coli* (Латексная тест-система *Campylobacter*) по ТУ 21.20.23-342-78095326-2021

Кампилобактериоз – пищевая инфекция, основными возбудителями которой являются бактерии *C. jejuni* (90% случаев) и *C. coli* (до 5% случаев), редко болезнь вызывают представители других видов кампилобактерий. Кампилобактериоз – самая распространенная в мире пищевая инфекция. Она регистрируется практически во всех странах мира, как индустриально развитых, так и развивающихся. Ежегодно в мире кампилобактериозом заболевают до 500 млн чел. [40]. В США, например, каждый год регистрируют около 1 млн случаев болезни. В Европейском союзе в период с 2005 по 2010 г. число лабораторно подтвержденных случаев кампилобактериоза составляло 197 362; в 2011 г. – 214 268 случаев, а в 2015 и 2016 гг. достигло 229 213 и 246 307 случаев соответственно [40]. В Канаде ежегодно регистрируют свыше 240 тыс. случаев кампилобактериоза. К сожалению, данные о распространении кампилобактериозной инфекции в РФ нам не известны. Кампилобактериоз поражает людей всех возрастов, однако чаще инфекцией заболевают 1–4-летние дети и молодые люди возраста от 15 до 24 лет [41].

Широкое распространение кампилобактериоза среди людей объясняется большим количеством и разнообразием естественных резервуаров и источников возбудителей болезни. Носителями являются многочисленные виды диких птиц и животных, однако основным источником кампилобактерий для человека выступают сельскохозяйственные животные и промышленная птица, особенно бройлерные цыплята. По нашим данным, бройлерная птица многих российских птицефабрик является носителем *C. jejuni*. Концентрация патогена в фекалиях бройлеров может достигать 10^{10} КОЕ/г [40]. Люди заболевают кампилобактериозом после употребления контаминированных *Campylobacter* воды, животной или растительной пищи. Заразиться можно и при непосред-

ственном контакте с сельскохозяйственными и домашними животными. Заражающая доза, установленная на взрослых волонтерах, колеблется между $8 \cdot 10^2$ и $2 \cdot 10^9$ КОЕ, в среднем $9 \cdot 10^4$ КОЕ [42]. Продолжительность инкубационного периода при кампилобактериозе составляет 1–7 дней, хотя чаще клинические симптомы появляются уже спустя 24–72 ч после употребления инфицированной пищи или воды. Основные клинические симптомы кампилобактериоза – острая водяная или кровавая диарея, повышенная температура, абдоминальные боли, тошнота, рвота, обезвоживание и потеря веса. По степени тяжести кампилобактериоз может превосходить сальмонеллез и шигеллез. Продолжается болезнь обычно 5–6 дней, после чего в большинстве случаев наступает самовыздоровление (без применения антимикробных препаратов). В тяжелых случаях применяют антибиотики из группы макролидов – эритромицин и азитромицин. Важно заметить, что в ряде случаев диарею могут вызвать и кампилобактерии других видов [42]. Кампилобактериозная инфекция у лиц с ослабленным иммунитетом может вызвать серьезные осложнения, как гастроинтестинальные (болезнь воспаленного кишечника, болезни пищевода, холецистит, рак прямой кишки и др.), так и экстрагастроинтестинальные (тяжелое аутоиммунное заболевание нервной системы синдром Гийена–Барре, поражение отдельных паренхиматозных органов, бактериемия и др.) [40].

Кампилобактерии – грамотрицательные неспорообразующие палочки изогнутой или спиралевидной формы, имеющие на концах один или два жгутика. При скоплении в группы кампилобактерии могут образовывать характерные формы в виде латинских букв S или V. При длительном хранении на питательных средах палочковидные формы могут трансформироваться в сферические или кокковидные [43]. Кампилобактерии относятся к группе микроаэрофилов, для их роста требуется низкое содержание кислорода (3–5%), высокая концентрация диоксида углерода (3–10%) и азота (85%). Ферментативная активность у кампилобактерий снижена. Они не ферментируют углеводы, в качестве источника энергии используют аминокислоты или промежуточные продукты цикла трикарбоновых кислот. *C. jejuni* и *C. coli* являются термофилами, они хорошо растут при температуре 37–42°C, оптимальная температура роста 41,5°C, они не растут при температуре <30°C. Кампилобактерии каталазо- и оксидазопозитивны. Важно отметить, что, в связи с высокой чувствительностью *Campylobacter* к кислороду и температуре ниже 30°C, они не способны размножаться вне макроорганизма, в т.ч. в продуктах питания. Кампилобактерии весьма чувствительны к высушиванию, солнечному свету, высоким и низким значениям pH, хорошо переносят замораживание [44].

Диагностика кампилобактериоза, в первую очередь, предполагает выделение возбудителя из фекалий больного, продуктов питания и других объектов внешней среды. Высевы исследуемого материала проводят на селективные среды, содержащие компоненты, способные поглощать кислород и обеспечивать питательные потребности микроба: кровь, ионы железа, пируваты, а также селективные антибиотики (среда Батцлера, Блазера и др.). В настоящее время для выделения кампилобактерий предложена хромогенная среда «CASA-агар» [45]. Для поиска и идентификации кампилобак-

терий, выросших на селективных средах, используют культуральные, иммунологические (ИФА, РЛА, ИХ-тесты), молекулярно-генетические (ПЦР-РВ, секвенирование генома) и физико-химические (MALDI-TOF MS) методы. Учитывая высокие показатели чувствительности и специфичности современных латексных диагностикумов, простоту их постановки и другие позитивные их качества, среди перечисленных методов для первичного отбора и идентификации *C. jejuni* и *C. coli* целесообразнее всего использовать РЛА.

Латексные диагностикумы для идентификации *C. jejuni* и *C. coli* разрабатывали в соответствии с предложенным нами алгоритмом. В качестве антигенов-мишеней *C. jejuni* и *C. coli* были использованы полисахаридные компоненты их липополисахаридов. Шестикратная п/к и в/в иммунизация кроликов убитыми нагреванием клетками патогенов позволила получить высокотитражные (1:160–1:320 в РДП) препараты IgG-антител. Полученными антителами сенсibilизировали латексные частицы, активированные карбоксильными группами. Чувствительность приготовленного диагностикума для идентификации *C. jejuni* была проверена на 100 штаммах *C. jejuni*, выделенных от промышленной птицы многих птицефабрик в РФ, а также на референс-штамме *C. jejuni* NCTS 11168. Все исследованные штаммы *C. jejuni* дали положительную РЛА, т.е. чувствительность диагностикума составила 100%. Специфичность диагностикума, проверенного на клинических и референс-штаммах *C. coli*, *Campylobacter lari*, а также *Salmonella* spp., *S. sonnei*, *S. flexneri*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Enterococcus faecium*, составила 96%. Чувствительность диагностикума для идентификации *C. coli* была изучена на двух штаммах *C. coli*, а специфичность – на 50 штаммах *C. jejuni*, а также на штаммах *Salmonella* spp., *S. sonnei*, *S. flexneri*, *E. coli*, *L. monocytogenes* и *E. faecium*. Показатель чувствительности диагностикума был равен 100%, специфичности – 95%. Производимые в ФБУН ГНЦ ПМБ латексные диагностикумы для идентификации *C. jejuni* и *C. coli* могут использоваться учреждениями Роспотребнадзора для санитарно-микробиологической оценки пищевых продуктов и объектов внешней среды.

Латексный диагностикум для быстрой идентификации *C. difficile* в реакции латекс-агглютинации, жидкий, «Латексная тест – система *C. difficile*» по ТУ 21.20.23 – 331 – 78095326 – 2020

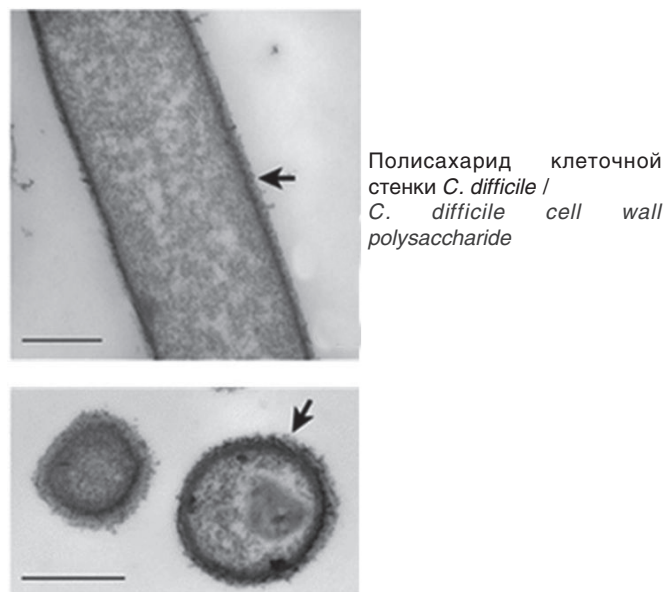
C. difficile – возбудитель тяжелой нозокомиальной (госпитальной) инфекции (*C. difficile*-инфекции (КДИ)), которая сопровождается водянистой диареей, интоксикацией и нередко опасным для жизни человека поражением толстого кишечника – псевдомембранозным колитом. Чаще всего КДИ заболевают иммунокомпрометированные и пожилые пациенты, длительно находящиеся на стационарном лечении и подвергающиеся интенсивной антибиотикотерапии. КДИ ответственна за развитие 10–20% случаев антибиотик-ассоциированных диарей, 50–75% антибиотик-ассоциированных колитов и практически всех случаев псевдомембранозного колита. Смертность от КДИ может достигать $\geq 10\%$ [46]. КДИ диагностируется во многих странах, но наиболее часто в США и Канаде, а также в странах Европы [46]. Начиная с 2000-х гг. КДИ регистрируется и в РФ, однако сведения о ее распространении весьма скудные.

C. difficile – грамположительные, строго анаэробные, спорообразующие, токсин-продуцирующие микроорганизмы, сравнительно широко распространенные во внешней среде. Vegetативные клетки *C. difficile*, выращенные на питательной среде и окрашенные по Граму, имеют форму палочек с закругленными концами, различной длины (3,0–16,9 мкм) и ширины (0,5–1,9 мкм). Попадая в неблагоприятные условия, вегетативные клетки *C. difficile* образуют расположенные субтерминально споры, которые благодаря высокой устойчивости к химическим и физическим факторам могут длительно (несколько месяцев) сохраняться во внешней среде, представляя потенциальную опасность для людей и животных.

Основными факторами вирулентности возбудителя КДИ являются белки S-слоя клеточной стенки, пептидогликан, полисахариды, многочисленные ферменты и токсины. Последние играют важнейшую роль в патогенезе инфекции: они повреждают эпителиальные клетки толстой кишки и вызывают их гибель. У *C. difficile* описано три основных токсина: токсин А (TcdA – энтеротоксин), токсин В (TcdB – цитотоксин) и бинарный токсин CDT [46]. Важно также отметить наличие на поверхности клеточной стенки *C. difficile* двух типов видоспецифических полисахаридов – PS-I и PS-II, обладающих видоспецифичностью. Следует отметить, что полисахарид PS-I встречается у *C. difficile* редко, а PS-II детектируется почти во всех штаммах [47].

C. difficile нередко встречается во внешней среде: возбудитель можно выделить из почвы, растений, сточных вод и других объектов. Однако основным резервуаром и источником токсигенных *C. difficile* являются больные КДИ и люди-бактерионосители. В качестве последних чаще всего выступает лечащий и обслуживающий персонал неблагополучных по КДИ лечебных учреждений. Вторым важным резервуаром и источником *C. difficile* являются сельскохозяйственные животные, в первую очередь свиньи, а также лошади, крупный рогатый скот и страусы [48]. Путь заражения человека – фекально-оральный. Инфицируются люди *C. difficile* при контакте с больными КДИ или людьми-бактерионосителями, а также с животными и контаминированными патогеном объектами внешней среды. Возможно заражение и после употребления пищи. Продолжительность инкубационного периода при КДИ 7 дней. Основные клинические признаки инфекции – водянистый (некровавый) понос, боли в животе, лихорадка, обезвоживание, интоксикация, гипотензия. При тяжелом течении болезни человек может погибнуть от токсического шока. Лечение КДИ – этиотропное и симптоматическое, восстановление водного баланса [49].

Для диагностики КДИ – обнаружения возбудителя или его токсинов в фекалиях больного – используют различные методы: микробиологический (выделение *C. difficile* на питательных средах и последующая его идентификация), иммунологические (ИФА), молекулярно-генетические (ПЦР-РВ), биофизические (MALDI-TOF MS). Несмотря на высокую разрешаемость современных молекулярно-генетических и иммунологических диагностических тест-систем, используемых в лабораторной практике, выделение чистой культуры возбудителя и изучение его свойств остается важнейшим условием научной организации лечения и профилактики КДИ. Наличие чистой культуры *C. difficile* позволяет опреде-



Полисахарид клеточной стенки *C. difficile* / *C. difficile* cell wall polysaccharide

Рис. 5. Видоспецифический антиген *C. difficile* – полисахарид PS-II [50].

Fig. 5. Species-specific antigen of *C. difficile* – polysaccharide PS-II [50].

лить чувствительность ее к антимикробным препаратам и обеспечить эффективную этиотропную терапию, охарактеризовать молекулярно-генетические свойства патогена (сиквент-тип, генетическая линия и др.) и определить его эпидемическую значимость и источник инфекции.

Как и при диагностике вышеописанных инфекций, наиболее приемлемым методом поиска и первичной идентификации колоний *C. difficile* среди колоний анаэробных бактерий, выросших на средах после посева исследуемого материала, является РЛА на стекле, хотя для этих целей можно использовать и более дорогие и более длительно выполняемые анализы – ПЦР-РВ и MALDI-TOF MS. При разработке латексного диагностикума для идентификации *C. difficile* в качестве антигена-мишени был выбран специфический для вида полисахарид клеточной стенки PS-II (рис. 5).

Выделяли указанный антиген из клеток *C. difficile* хроматографическими методами. Высокоаффинные к PS-II полисахариду IgG-антитела получали 6-кратной п/к и в/в иммунизацией кроликов взвесью убитых нагреванием вегетативных клеток *C. difficile* и последующего выделения из гипериммунной сыворотки специфических IgG-антител. Сенсибилизировали латексные частицы специфическими IgG-антителами через пептидную связь. Приготовленный латексный диагностикум имел 100%-ю чувствительность: он давал положительную РЛА на стекле со всеми штаммами *C. difficile*, выделенными от больных в РФ ($n = 34$) и США ($n = 1$). Специфичность диагностикума, проверенного на штаммах клостридий других видов, *C. perfringens*, *C. sporogenus* и *C. sordellii* ($n = 15$), а также *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. и *Campylobacter* spp. ($n = 21$), составила 97%.

Изготавливаемый в ФБУН ГНЦ ПМБ коммерческий препарат латексного диагностикума для идентификации *C. difficile* может использоваться учреждениями Роспотребнадзора для санитарно-микробиологической оценки пищевых продуктов, воды и объектов внешней среды.

Заключение

За последние 10 лет в ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии разработаны и производятся латексные диагностикумы для быстрой идентификации 18 видов возбудителей бактериальных инфекций: легионеллеза (*Legionella pneumophila* серотип 1), гнойных бактериальных менингитов (*Haemophilus influenzae* тип b, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* типы A, B, C и W135), листериоза (*L. monocytogenes*), эшерихиоза (шигетоксин-продуцирующие штаммы *E. coli* серотипов O157:H7 и O104:H4), шигеллеза (*S. flexneri*, *S. sonnei* и *S. dysenteriae*), йерсиниоза (*Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*), кампилобактериоза (*C. jejuni* и *C. coli*) и псевдомембранозного колита (*C. difficile*). Для приготовления диагностикумов использовали коммерческие латексные частицы диаметром 0,8 мкм, активизированные либо карбоксильными группами, либо рекомбинантным стрептавидином. В качестве антигенов-мишеней использовали в основном полисахаридные компоненты липополисахаридов наружных мембран либо полисахариды капсул. При приготовлении латексного диагностикума для идентификации *L. monocytogenes* использовали специфический для *L. monocytogenes* белковый антиген ActA. Разработанные латексные диагностикумы имеют 100%-ю чувствительность и высокую специфичность (95–98%). Пять латексных тест-систем – для идентификации *L. pneumophilla* серотип 1, возбудителей гнойных бактериальных менингитов (*H. influenzae* тип b, *S. pneumoniae* и *N. meningitidis* типы A, B, C, W135), *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 и *E. coli* O104:H4 – зарегистрированы в РФ и используются во многих диагностических учреждениях страны. Научно-техническая документация на производство остальных латексных тест-систем утверждена руководителем ФБУН ГНЦ ПМБ. Эти диагностикумы могут использоваться диагностическими лабораториями учреждений Роспотребнадзора для микробиологической оценки пищевых продуктов и объектов внешней среды.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

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

Конфликт интересов

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

Conflict of interest

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

Литература / References

1. Чистенко ГН, Дронина АМ, Бандацкая МИ. Листериоз: этиология, эпидемиология, профилактика. Мир медицины. 2015;3:2-5. / Chistenko GN, Dronina AM, Bandatskaya MI. Listeriosis: etiology, Epidemiology, prophylaxis. Medical World. 2015;3:2-5. (In Russian).
2. Хаптанова НМ, Андреевская НМ, Лукьянова СВ, Коновалова ЖА, Gefan НГ, Остяк АС, и др. Особенности серологической диагностики листериоза (обзор

литературы). Acta biomedica scientifica. 2019;4:43-49. / Khaptanova NM, Andreevskaya NM, Lukyanova SV, Konovalova ZhA, Gefan NG, Ostyak AS, et al. Peculiarities of serological diagnosis of listeriosis (literature review). Acta biomedica scientifica. 2019;4:43-49. DOI: 10.29413/ABS.2019-4.1.7 (In Russian).

3. Osek J, Lachtara B, Wiczorek K. Listeria monocytogenes – How This Pathogen Survives in Food-Production Environments? Front Microbiol. 2022 Apr 26;13:866462. DOI: 10.3389/fmicb.2022.866462
4. Gartley S, Anderson-Coughlin B, Sharma M, Kniel KE. Listeria monocytogenes in Irrigation Water: An Assessment of Outbreaks, Sources, Prevalence, and Persistence. Microorganisms. 2022;10:1319-1328. DOI: 10.3390/microorganisms10071319
5. Kramer M, Galarza E, Atam S, Bondarenko D, Mukhtar L, Tzarnas S, et al. A rare case of Listeria monocytogenes presenting as septic shock. Critical Care Medicine. 2023;51:269-276. DOI: 10.1097/01.ccm.0000907976.72803.1b
6. Osek J, Wiczorek K. Listeria monocytogenes – How This Pathogen Uses Its Virulence Mechanisms to Infect the Hosts. Pathogens. 2022; 11:1491-1498. DOI: 10.3390/pathogens11121491
7. Gui-Xian W, Jian-Ya Z, Wei-Jun H. Treatment failure in a patient infected with Listeria sepsis combined with latent meningitis: A case report. World J Clin Cases. 2022; 10:10565-10574. DOI: 10.12998/wjcc. v10.i29.10565
8. Wisniewski P, Zakrzewski AJ, Zadernowska A, Chajęcka-Wierzchowska W. Antimicrobial Resistance and Virulence Characterization of Listeria monocytogenes Strains Isolated from Food and Food Processing Environments. Pathogens. 2022;11:1099-1105. DOI:10.3390/pathogens11101099
9. Светоч ЭА, Ерусланов БВ, Мицевич ИП, Храмов МВ, Перескокова ЕС, Фурсова НК. Алгоритм разработки и характеристика диагностических латексных тест-систем, производимых в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии (часть 1). Бактериология. 2023;8(2) (в печати). / Svetoch EA, Eruslanov BV, Micevich IP, Khramov MV, Pereskokova ES, Fursova NK. Algorithm of development and characterization of diagnostic latex test systems produced at the State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology (part 1). Bacteriology. 2023;8(2) (in press). (In Russian).
10. Travier L, Lecuit M. Listeria monocytogenes ActA: a new function for a 'classic' virulence factor. Curr Opin Microbiol. 2014;17:53-60. DOI: 10.1016/j.mib.2013.11.007
11. Reddy S, Lawrence ML. Virulence characterization of Listeria monocytogenes. Methods Mol Biol. 2014;1157:157-165. DOI: 10.1007/978-1-4939-0703-8_13
12. Карцев НН, Светоч ЭА. Эпидемиология, свойства и лабораторная диагностика шига-токсин продуцирующих Escherichia coli. Бактериология. 2018;3(1):7-12. / Kartsev NN, Svetoch EA. Epidemiology, properties and laboratory diagnosis of shiga-toxin producing Escherichia coli. Bacteriology. 2018;3(1):7-12. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-7-12 (In Russian).
13. Малов ВА, Малеев ВВ, Козловская НЛ, Цветкова НА, Сметанина СВ, Горобченко АН, и др. Трудности диагностики гемолитико-уремического синдрома, ассоциированного с диареей, у взрослых. Терапевтический архив. 2017;89(11):69-78. / Malov VA, Maleev VV, Kozlovskaya NL, Tzvetkova NA, Smetanina SV, Gorobchenko AN, et al. Difficulties in diagnosis of hemolytic-uremic syndrome associated with diarrhea in adults. Therapeutic Archives. 2017;89(11):69-78. DOI: 10.17116/terarkh2017891169-78 (In Russian).
14. Gambushe SM, Zishiri OT, El Zowalaty ME. Review of Escherichia coli O157:H7 Prevalence, Pathogenicity, Heavy Metal and Antimicrobial Resistance, African Perspective. Infect Drug Resist. 2022;15:4645-4673. DOI: 10.2147/IDR.S365269
15. Youn L, Jang W, Hovde C. A Brief Overview of Escherichia coli O157:H7 and Its Plasmid O157. J Microbiol Biotechnol. 2010;20:5-14.
16. Kolodziejek AM, Minnich SA, Hovde CJ. Escherichia coli O157:H7 virulence factors and the ruminant reservoir. Curr Opin Infect Dis. 2022;35(3):205-214. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000834
17. Castro VS, Ortega Polo R, Figueiredo EE, Bumunange EW, McAllister T, King R, et al. Inconsistent PCR detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli: Insights

- from whole genome sequence analyses. PLOS ONE. 2021;16(9):e0257168. DOI: 10.1371/journal.pone.0257168
18. Swelum A, Elbestawy A, El-Saadony M, Hussein EOS, Alhotan R, Suliman GM, et al. Ways to minimize bacterial infections, with special reference to *Escherichia coli*, to cope with the first-week mortality in chicks: an updated overview. Poultry Science. 2021;100:101039-101045. DOI: 10.1016/j.psj.2021.101039
19. Yaraymi O, Norma H, Santos G. Boundaries that prevent or may lead animals to be reservoirs of *Escherichia coli* O104:H4. J of Food Protection. 2023;86:1-11. DOI: 10.1016/j.jfp.2023.100053
20. Wöchtl B, Gunzer F, Gerner W. Comparison of clinical and immunological findings in gnotobiotic piglets infected with *Escherichia coli* O104:H4 outbreak strain and EHEC O157:H7. Gut Pathog. 2017;9:30-38. DOI 10.1186/s13099-017-0179-8
21. Kunsmann L, Rüter C, Bauwens A, Greune L, Glüder M, Kemper B, et al. Virulence from vesicles: Novel mechanisms of host cell injury by *Escherichia coli* O104:H4 outbreak strain. Scientific Reports. 2015;5:10-17. DOI: 10.1038/srep13252
22. Каримова ТВ, Климов ВТ, Чеснокова МВ. Молекулярно-биологическая характеристика *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica*, выделенных в Сибири и на Дальнем Востоке. Бюллетень ВШЦ СО РАМН. 2016;3:60-64. / Karimova TV, Klimov VT, Chesnokova MV. Molecular and biological characteristics of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* isolated in Siberia and the Far East. Bulletin of the All-Russian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences. 2016;3:60-64. (In Russian).
23. Чеснокова МВ, Климов ВТ, Никитин АЯ, Ярыгина МБ, Иннокентьева ТИ, Балахонов СВ. Анализ эпидемиологической ситуации по псевдотуберкулезу и кишечному иерсиниозу в России и прогноз заболеваемости на среднесрочную перспективу. ЗНиСО. 2018;9(306):59-64. / Chesnokova MV, Klimov VT, Nikitin AY, Yarigina MB, Innokentieva TI, Balakhonov SV. Analysis of the epidemiological situation of pseudotuberculosis and intestinal yersiniosis in Russia and the forecast of morbidity in the medium term. ZNiSO. 2018;9(306):59-64. (In Russian).
24. Чеснокова МВ, Климов ВТ, Каримова ТВ, Загоскина ТЮ, Панин АЛ. Лабораторная диагностика псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2021;5:224-237. / Chesnokova MV, Klimov VT, Karimova TW, Zagoskina TYu, Panin AL. Laboratory diagnosis of pseudotuberculosis and intestinal yersiniosis. Epidemiology and Infectious Diseases. 2021;5:224-237. DOI: 10.17816/EID108746 (In Russian).
25. Rastawicki W, Szych J, Rokosz N, Zacharczuk K, Gierczyński R. Seasonality of *Yersinia enterocolitica* bioserotype 1B/O:8 infections in Poland. Epidemiol Infect. 2013;141(10):2039-2042. DOI: 10.1017/S0950268812002786
26. Platt-Samoraj A. Toxigenic Properties of *Yersinia enterocolitica* Biotype 1A. Toxins. 2022;14:118-123. DOI: 10.3390/toxins14020118
27. Virtanen S, Salonen L, Laukkanen-Ninios R, Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H. Piglets are a source of pathogenic *Yersinia enterocolitica* on fattening-pig farms. Appl Environ Microbiol. 2012;78(8):3000-3003. DOI:10.1128/AEM.07805-11
28. Carniel E, Autenrieth I, Cornelis G, Fukushima H, Guinet F, Isberg R, et al. *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. (eds). The Prokaryotes. 2021, Springer, New York, NY. DOI: 10.1007/0-387-30746-X_13
29. Iurukov M, Slavchev G. Podobren metod za izolirane na *Yersinia enterocolitica* [Improved method for isolating *Yersinia enterocolitica*]. Vet Med Nauki. 1984;21(6):75-83.
30. Джaparова АК, Eroshenko GA, Nikiforov KA, Kukleva LM, Alkhova ZhV, Berdiev SK, et al. Характеристика и филогенетический анализ штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* из Сарыджазского высокогорного очага в Тянь-Шане. Проблемы особо опасных инфекций. 2021;2:87-93. / Dzhaparova AK, Eroshenko GA, Nikiforov KA, Kukleva LM, Alkhova ZhV, Berdiev SK, et al. Characterization and phylogenetic analysis of *Yersinia pseudotuberculosis* strains from the Saryjaz highland focus in Tien Shan. Problems of Extremely Dangerous Infections. 2021;2:87-93. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-87-93 (In Russian).
31. Сомова ЛМ, Шубин ФН, Дробот ЕИ, Плехова НГ, Ляпун ИН. Плазмидоассоциированная вирулентность *Yersinia pseudotuberculosis* и инфекционный процесс. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016;6:74-85. / Somova LM, Shubin FN, Drobot EI, Plekhova NG, Lyapun IN. Plasmido-associated virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* and the infection process. J. Microbiol Epidemiol Immunobiol. 2016;6:74-85. (In Russian).
32. Le Guern A, Martin L, Savin C, Carniel E. Yersiniosis in France: overview and potential sources of infection. Int J Infect Dis. 2016;46:1-7. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.03.008
33. Heuvelmans M, Lammertink M, Kusters J, Bruns AHW, Monkelbaan JF. *Yersinia pseudotuberculosis* infection with severe localised inflammation and ulceration of the ileum in a heart transplant patient. BMJ Case Rep. 2020;13(12):e236343. DOI: 10.1136/bcr-2020-236343
34. Laporte J, Savin C, Lamourette P, Devilliers K, Volland H, Carniel E, et al. Fast and sensitive detection of enteropathogenic *Yersinia* by immunoassays. J Clin Microbiol. 2015;53:146-159. DOI:10.1128/JCM.02137-14
35. Матъякубова ФЭ, Ибрагимова ЭФ, Бахриева ЗД. Клинико-эпидемиологическая характеристика шигеллеза у взрослых на современном этапе. Вестник науки и образования. 2020;22:64-72. / Mat'yakubova FE, Ibragimova EF, Bakhrieva ZD. Clinical and epidemiological characteristics of shigellosis in adults at the present stage. Bulletin of Science and Education. 2020;22:64-72. (In Russian).
36. Kotloff K, Riddle M, Platts-Mills J. Shigellosis. Lancet. 2018;24:801-812. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)33296-8
37. Абрамцева МВ, Неманова ЕО, Алехина НС. Перспективные направления разработки вакцинных препаратов для профилактики шигеллеза. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2022;22(3):249-265. / Abramtseva MV, Nemanova EO, Alekhina NS. Prospective directions of development of vaccine preparations for prevention of shigellosis. BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2022;22(3):249-265. DOI: 10.30895/2221-996X-2022-22-3-249-265 (In Russian).
38. O'Ryan M, Vidal R, del Canto F, Carlos Salazar J, Montero D. Vaccines for viral and bacterial pathogens causing acute gastroenteritis: Part II: Vaccines for Shigella, Salmonella, enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) and *Campylobacter jejuni*. Human Vaccines and Immunotherapeutics. 2015;3:601-619.
39. Singh K. Laboratory-acquired infections. Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America. 2009;49(1):142-147. DOI: 10.1086/599104
40. Светоч ЭА, Ерусланов БВ, Мицевич ИП, Фурсова НК. Кампилобактериозная пищевая инфекция. Микробиологический контроль качества пищевой продукции. Коллективная монография. Под ред. Поповой АЮ, Дятлова ИА. М.: Издательство «Династия», 2020;198-232. / Svetoch EA, Eruslanov BV, Mitsevich IP, Fursova NK. Campylobacteriosis food infection. Microbiological control of food quality. Collective monograph, ed. by Popova AY, Dyatlov IA. M.: Publishing house "Dynasty", 2020;198-232. (In Russian).
41. Lin J. Novel approaches for *Campylobacter* control in poultry. Foodborne Pathog Dis. 2009;6(7):755-65. DOI: 10.1089/fpd.2008.0247
42. Epps SV, Harvey RB, Hume ME, Phillips TD, Anderson RC, Nisbet DJ. Foodborne *Campylobacter*: infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs. Int J Environ Res Public Health. 2013;10(12):6292-304. DOI: 10.3390/ijerph10126292
43. Hinnenkamp R, Sorenson S, Evanson E, Yoder J, Mattioli M. Notes from the field: *Campylobacteriosis* outbreak associated with consumption of raw water – Montana, 2022. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2023;72(15):411-412. DOI: 10.15585/mmwr.mm7215a6
44. Aicha B, Mohamed E, Abdelhakim B. A review of current knowledge and gaps about *campylobacter* methods: from culture to characterization. J Microbiol Biotech Food Sci. 2022;11(4):e4154. DOI: 10.55251/jmbfs.4154
45. Facciola A, Riso R, Avventuroso E, Visalli G, Delia SA, Laganà P. *Campylobacter*: from microbiology to prevention. J Prev Med Hyg. 2017;58(2):79-92.

46. Ерусланов БВ, Светоч ЭА, Мицевич ИП, Фурсова НК. Clostridioides difficile – возбудитель антибиотик-ассоциированной диареи и псевдомембранозного колита (часть 2). Бактериология. 2022;7(3):94-108. / Eruslanov BV, Svetoch EA, Mitsevich IP, Fursova NK. Clostridioides difficile – causative agent of antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis (part 2). Bacteriology. 2022;7(3):94-108. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-3-94-108 (In Russian).
47. Lanzoni-Mangutchi P, Banerji O, Wilson J, Barwinska-Sendra A, Kirk JA, Vaz F, et al. Structure and assembly of the S-layer in C. difficile. Nat Commun. 2022;13:1-13. DOI:10.1038/s41467-022-28196-w
48. Chisholm J, Putsathit P, Riley T, Lim S. Spore-Forming Clostridium (Clostridioides) difficile in Wastewater Treatment Plants in Western Australia. Microbiol Spectr. 2023;11(1):e0358222. DOI:10.1128/spectrum.03582-2251
49. Czepiel J, Drózdzi M, Pituch H, Kuijper EJ, Perucki W, Mielimonka A, et al. Clostridium difficile infection: review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019;38(7):1211-1221. DOI: 10.1007/s10096-019-03539-6
50. Cox AD, St Michael F, Aubry A, Strong PCR, Hayes AC, Logan SM. Comparison of polysaccharide glycoconjugates as candidate vaccines to combat Clostridioides (Clostridium) difficile. Glycoconj J. 2021;38(4):493-508. DOI: 10.1007/s10719-020-09937-9

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

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

Карцев Николай Николаевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Information about co-authors:

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

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

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

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

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

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

НОВОСТИ НАУКИ

Неадекватное использование антибиотиков в странах с низким и средним уровнем дохода нарушает здоровье кишечника младенцев и усиливает устойчивость к противомикробным препаратам

Обобщены исследования, проведенные в странах с низким и средним доходом у детей, в которых сообщалось о влиянии антибиотиков на кишечные бактерии и определялись их гены устойчивости к антибиотикам.

Отмечено, что среди детей в странах с низким и средним уровнем доходов антибиотики обычно уменьшали количество бактериальных таксонов в кишечнике и увеличивали количество бактериальных таксонов с AMR.

Исследование показывает, что использование антибиотиков изменяет состав микробиома кишечника и может отрицательно повлиять на здоровье детей в странах с низким и средним доходом, например, подвергая их риску развития устойчивых к противомикробным препаратам инфекций.

Использование антибиотиков в этих группах населения должно лучше регулироваться, чтобы предотвратить косвенные последствия применения антибиотиков и снизить риск развития резистентности к противомикробным препаратам.



Luchen CC, Chibuye M, Spijker R, et al.

Impact of antibiotics on gut microbiome composition and resistome in the first years of life in low- to middle-income countries: A systematic review.

PLoS Med. 2023 Jun 27;20(6):e1004235. DOI: 10.1371/journal.pmed.1004235

Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Francisella tularensis*, выделенных во время эпизоотии 2022–2023 гг. в Ростовской области и Донецкой Народной Республике

В.М.Сорокин, Н.В.Павлович, М.В.Цимбалистова, А.С.Водопьянов, Р.В.Писанов, А.К.Носков

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Существование на территории Российской Федерации стабильных природных очагов бактериальных и вирусных инфекций определяет риск возникновения эпидемических осложнений и обосновывает одну из основных задач общественного здравоохранения – обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Туляремия является природно-очаговой инфекцией и отнесена к особо опасным заболеваниям человека. В силу географических и климатических условий Ростовская область является территорией, эндемичной по данной инфекции. Следует учитывать также существование трансграничных очагов туляремии. Цель нашего исследования заключалась в изучении биологических свойств и генетических характеристик штаммов возбудителя туляремии, изолированных из природных очагов Ростовской области и Донецкой Народной Республики в 2022–2023 гг. Во время эпизоотии 2022–2023 гг. выделено 16 культур возбудителя туляремии. Установлено, что все выделенные штаммы относятся к виду *Francisella tularensis* подвида *holarctica* биовара Ery^R. Применение методов INDEL-типирования позволило подтвердить, что все изолированные штаммы относятся к подвиду *holarctica*, и установить их принадлежность к основной генетической подгруппе В.12. Проведено полногеномное секвенирование 16 штаммов *F. tularensis* и показано, что они относятся к двум разным генотипам – В.170 и В.203, согласно схеме «канонических SNP». Расширенное генотипирование с использованием 6626 SNP подтвердило разделение штаммов 2022–2023 гг. на два кластера. Штаммы *F. tularensis*, выделенные в ДНР, оказались генетически близки штаммам, изолированным на территории трех районов Ростовской области, что позволяет подтвердить гипотезу о существовании трансграничного очага туляремии. Анализ результатов VNTR-генотипирования подтвердил разделение 16 штаммов 2022–2023 гг. на два разных VNTR-генотипа и позволил выявить более тонкие различия в генотипах штаммов в данной популяции туляремийного микроба. Простой и быстрый метод VNTR является методом выбора для проведения филогенетического анализа.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, полногеномное секвенирование, SNP, INDEL, VNTR, полимеразная цепная реакция, филогенетический анализ

Для цитирования: Сорокин В.М., Павлович Н.В., Цимбалистова М.В., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Носков А.К. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Francisella tularensis*, выделенных во время эпизоотии 2022–2023 гг. в Ростовской области и Донецкой Народной Республике. Бактериология. 2023; 8(3): 68–74. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-68-74

Molecular genetic characteristics of *Francisella tularensis* strains during the 2022–2023 epizooty in the Rostov region and the Donetsk People's Republic

V.M.Sorokin, N.V.Pavlovich, M.V.Tsimbalistova, A.S.Vodopyanov, R.V.Pisanov, A.K.Noskov

Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation

The existence of stable natural foci of bacterial and viral infections on the territory of the Russian Federation determines the risk of epidemic complications and substantiates one of the main tasks of public health – ensuring the sanitary and epidemiological well-being of the population. Tularemia is a natural focal infection and is classified as a particularly dangerous human disease. Due to geographical and climatic conditions, the Rostov region is a territory endemic for this infection. The existence of cross-border foci of tularemia should also be taken into account. The purpose of our study was to study the biological properties and genetic characteristics of tularemia pathogen strains isolated from natural foci of the Rostov region and the DPR in 2022–2023. During the

Для корреспонденции:

Сорокин Владимир Михайлович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории природноочаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-91-13
E-mail: soroka53@mail.ru

Статья поступила 10.07.2023, принята к печати 29.09.2023

For correspondence:

Vladimir M. Sorokin, PhD in Biological Sciences, senior researcher of the natural focal and zoonotic infections laboratory of Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

Address: 117/40 M.Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: (863) 240-91-13
E-mail: soroka53@mail.ru

The article was received 10.07.2023, accepted for publication 29.09.2023

2022–2023 epizootic, 16 cultures of the tularemia pathogen were isolated. It was established that all isolated strains belong to the species *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* biovar Ery^R. The use of INDEL-typing methods made it possible to confirm that all isolated strains belong to the subspecies *holarctica* and to establish their belonging to the main genetic subgroup B.12. Whole genome sequencing of 16 strains of *F. tularensis* was carried out and it was shown that they belong to two different genotypes B.170 and B.203, according to the «canonical SNP» scheme. Extended genotyping using 6626 SNPs confirmed the separation of the 2022–2023 strains into two clusters. The strains of *F. tularensis* isolated in the DPR turned out to be genetically close to the strains isolated in the territory of three districts of the Rostov region, which allows us to confirm the hypothesis of the existence of a transboundary focus of tularemia. Analysis of the results of VNTR-genotyping confirmed the division of 16 strains of 2022–2023 years into two different VNTR genotypes and revealed more subtle differences in strain genotypes in this tularemia microbe population. The simple and fast VNTR method is the method of choice for phylogenetic analysis.

Key words: *Francisella tularensis*, whole genome sequencing, SNP, INDEL, VNTR, PCR, phylogenetic analysis

For citation: Sorokin V.M., Pavlovich N.V., Tsimbalistova M.V., Vodopyanov A.S., Pisanov R.V., Noskov A.K. Molecular genetic characteristics of *Francisella tularensis* strains during the 2022–2023 epizooty in the Rostov region and the Donetsk People's Republic. *Bacteriology*. 2023; 8(3): 68–74. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-68-74

Существование на территории Российской Федерации (РФ) стабильных природных очагов бактериальных и вирусных инфекций определяет риск возникновения эпидемических осложнений и обосновывает одну из основных задач общественного здравоохранения – обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения. В настоящее время в РФ реализуется Федеральная программа «Санитарный щит», направленная на противодействие завозу и распространению возбудителей инфекционных заболеваний. Кроме того, в рамках программы предусматривается постоянный мониторинг активности очагов природно-очаговых и зоонозных инфекций, расположенных на территории РФ и сопредельных регионов.

Туляремия является природно-очаговой инфекцией и отнесена к особо опасным заболеваниям человека. Эндемичные очаги инфекции широко распространены в северном полушарии земного шара: в Европе заболевание встречается практически во всех странах, включая Россию. Особого внимания заслуживает тот факт, что в последние десятилетия прослеживается четкая тенденция не только к активизации известных очагов, но и к формированию новых на территориях, ранее благополучных по туляремии.

В силу географических и климатических условий Ростовская область (РО) является территорией, эндемичной по данной инфекции. Поэтому проблема туляремии на сегодняшний день остается актуальной для области, так как природные очаги пойменно-болотного и степного типов зарегистрированы в 36 муниципальных образованиях [1]. На территории Украины существует 51 природный очаг туляремии [1–3]. Следует учитывать также существование трансграничных очагов туляремии, в частности, на границе РО и Донецкой Народной Республики (ДНР) [4]. Следует подчеркнуть, что с 1996 по 2017 г. эпидемическая ситуация по туляремии в области оценивалась как стабильно благополучная [1]. В 2020 г. было проведено эпизоотологическое обследование территории РО и выделены 6 культур возбудителя туляремии от мелких грызунов, собранных в Сальском и Ремонтненском районах РО. В 2022–2023 гг. зафиксирована эпизоотия среди грызунов в трех районах РО (Целинский, Ремонтненский, Неклиновский) и одном районе ДНР (Новоазовский) с выделением 16 культур возбудителя туляремии.

Цель исследования заключалась в изучении биологических свойств и генетических характеристик штаммов возбудителя туляремии, изолированных из природных очагов Ростовской области и ДНР в 2022–2023 гг.

Материалы и методы

Штаммы *Francisella tularensis*, использованные в работе, были выделены во время эпизоотии 2022–2023 гг. в РО и ДНР.

Бактерии *F. tularensis* выращивали на среде Т в течение 24 ч при 37°C. Культурально-морфологические, биохимические и биологические свойства туляремийного микроба изучали в соответствии с МУ 3.1.2007-05 «Эпидемиологический надзор за туляремией» [5]. Антибиотикочувствительность исследуемых культур изучали диско-диффузионным методом согласно МУК 4.2.2495-09 «Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сап, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам» [6].

Полногеномное секвенирование проводили на платформе MiSeq Illumina. Сборку геномов, представленных в виде ридов, проводили с использованием программы Spades [7]. Для сравнительного анализа использовали данные, полученные из базы данных NCBI.

Для анализа применяли авторское программное обеспечение GeneExpert, PrimerM и VirtualPCR, написанное на языке программирования Java. Кластерный анализ проводили с использованием метода UPGMA, для построения дендрограммы использовали программу MEGA 5. Для определения «канонических SNP» использовано свободное программное обеспечение CanSNPer2 [8]. Алгоритм выбора SNP для анализа WGS описан ранее [9].

Конструирование праймеров и проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) *in silico* осуществляли при помощи программ Primer3Plus и авторской программы VirtualPCR. Кластерный анализ и построение филогенетического дерева проводили с использованием программы GrapeTree (алгоритм NJ) [10]. Для оптимизации набора VNTR-локусов с целью получения максимального числа индивидуальных генотипов была использована программа AuSeTTS (Automated Selection of Typing Target Subsets) [11].

Для детекции VNTR-локусов ПЦР проводили отдельно для каждого из 5 локусов. Температура отжига составляла 55°C для всех локусов (M3, M6, M10, M20A, M24). Продукты амплификации анализировали в 8%-м полиакриламидном геле и определяли размер амплифицированных фрагментов по стандарту молекулярных масс с помощью программы Quantity One.

Результаты исследования и их обсуждение

При изучении выделенных культур с помощью традиционных микробиологических методов (культурально-морфологические, биохимические, антигенные свойства, патогенность для лабораторных животных) установлено, что все они относятся к виду *F. tularensis*. С помощью разработанных ранее биохимических экспресс-тестов дополнительно проведена внутривидовая дифференциация культур [12–14]. Установлено, что все выделенные штаммы относились к виду *F. tularensis* подвида *holarctica* биовара Ery^R. В настоящее время молекулярно-биологические методы исследования инфекционных агентов приобретают все большее значение в связи с их информативностью и возможностью определить филогенетическое родство тех или иных штаммов. Применение методов INDEL-типирования [15, 16] позволило подтвердить, что все изолированные штаммы относятся к подвиду *holarctica*, и установить их принадлежность к основной генетической подгруппе В.12.

Проведено полногеномное секвенирование 16 штаммов *F. tularensis*, выделенных в трех районах РО (Целинский, Ремонтненский, Неклиновский) и одном районе ДНР (Новоазовский). Использование схемы «канонических SNP» [8] показало, что они относятся к двум разным генотипам – В.170 и В.203 (таблица).

Штаммы *F. tularensis*, выделенные в Новоазовском районе ДНР, представлены генотипом В.203, в то время как штаммы из трех районов РО принадлежат к обоим установленным генотипам.

Проведение расширенного генотипирования с использованием 6626 SNP позволило построить дендрограмму, отражающую генетическую близость между различными штаммами (рис. 1). Анализ дендрограммы подтвердил разделение штаммов 2022–2023 гг. на два кластера – А и В.

Штаммы *F. tularensis*, выделенные в ДНР (Новоазовский район), оказались генетически близки штаммам, изолированным на территории трех районов РО, что позволяет подтвердить гипотезу о существовании трансграничного очага туляремии [4] (рис. 2).

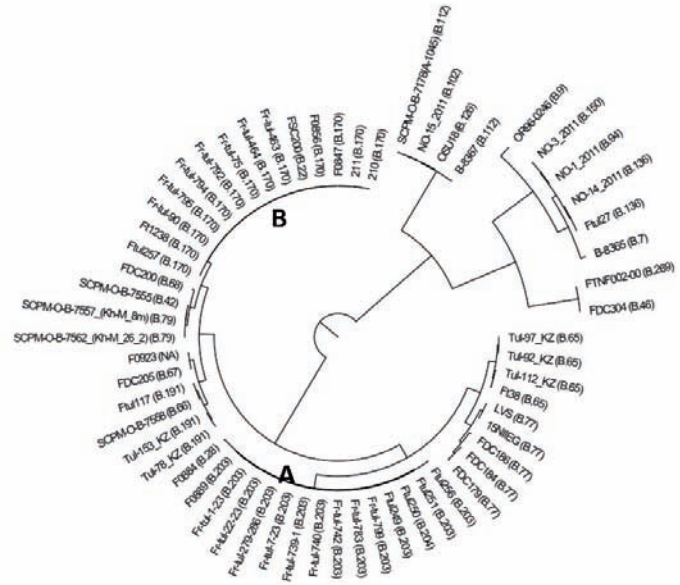


Рис. 1. Фрагмент дендрограммы, построенной по итогам анализа 6626 SNP.
 Fig. 1. Fragment of a dendrogram constructed based on the results of the analysis of 6626 SNPs.

С целью выявления корреляции результатов генотипирования *F. tularensis* разными методами было проведено MLVA-типирование по 5 VNTR-локусам штаммов *F. tularensis*, выделенных во время эпизоотии 2022–2023 гг., а также из природных очагов России и Европы. VNTR-анализ российских штаммов, включая 13 выделенных до 2022 г. в Ростовской области, проводили *in vitro*. Типирование европейских штаммов проводили *in silico* с использованием базы данных GenBank. Дендрограмма сформирована с использованием программы GrapeTree по алгоритму NJ и приведена на рис. 3.

Анализ результатов VNTR-генотипирования подтвердил разделение 16 штаммов 2022–2023 г. на два разных VNTR-генотипа (А и В), соответствующих кластерам, выявленным при SNP-типировании. При этом следует особо подчеркнуть

Таблица. Фрагмент таблицы генотипов выделенных штаммов, согласно схеме «канонических SNP» [8]
 Table. Fragment of the table of genotypes of isolated strains, according to the «canonical SNP» scheme [8]

Номер штамма / Strain number	Место выделения / Selection site	Тип CanSNP / CanSNP tipe	CanSNP-путь / CanSNP pass
464	Целинский р-н, п. Северный / Tselinsky district, Severny village	В.170	В.12;В.72;В.13;В.26;В.42;В.168;В.21;В.170
740	Новоазовский р-н, с. Роза-Люксембург / Novoazovsky district, Rosa-Luxembourg village	В.203	В.12;В.72;В.13;В.27;В.203
742	Новоазовский р-н, с. Кузнецы / Novoazovsky district, Kuznetsy village	В.203	В.12;В.72;В.13;В.27;В.203
279-286	Новоазовский р-н, с. Кузнецы / Novoazovsky district, Kuznetsy village	В.203	В.12;В.72;В.13;В.27;В.203
739-1	Новоазовский р-н, с. Порохня / Novoazovsky district, Porokhny village	В.203	В.12;В.72;В.13;В.27;В.203
783	Неклиновский р-н, пос. Приморка / Neklinovsky district, Primorka village	В.203	В.12;В.72;В.13;В.27;В.203
794	Целинский р-н, п. Сладкая Балка / Tselinsky district, Sladkaya Balka village	В.170	В.12;В.72;В.13;В.26;В.42;В.168;В.21;В.170
795	Целинский р-н, с. Лопанка / Tselinsky district, Lopanka village	В.170	В.12;В.72;В.13;В.26;В.42;В.168;В.21;В.170

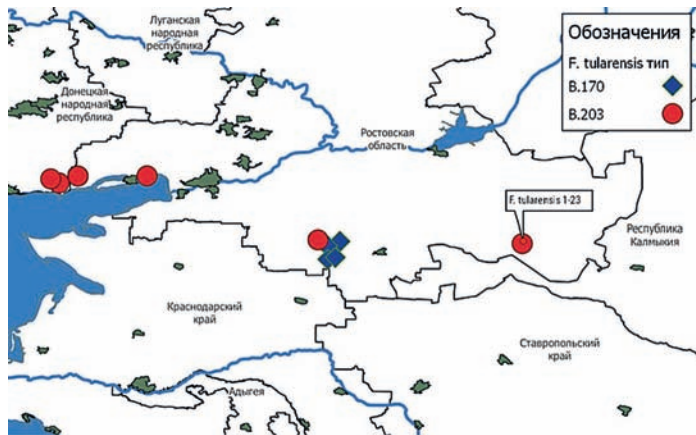


Рис. 2. Районы выделения штаммов *F. tularensis*.
Fig. 2. *F. tularensis* isolation areas.

тот факт, что обнаружены различия во взаимном расположении генотипов некоторых штаммов по версии SNP и VNTR-типирования. Штаммы, входящие в кластер А по версии SNP (рис. 1), представлены тремя группами близкородственных штаммов по версии VNTR (рис. 3). Такое же распределение наблюдается и для кластера В. Таким образом, метод VNTR-типирования позволяет выявить более тонкие различия в генотипах штаммов, по крайней мере в данной популяции туляремийного микроба.

Метод VNTR-генотипирования позволил ранее определить 4 VNTR-генотипа при анализе штаммов, изолированных в РО во время эпизоотии 2020 г. [17], причем 2 из этих 4 генотипов выявлены также и в 2022–2023 г., а другие два относятся к тем же кластерам А и В по версии SNP-типирования (рис. 1, 3).

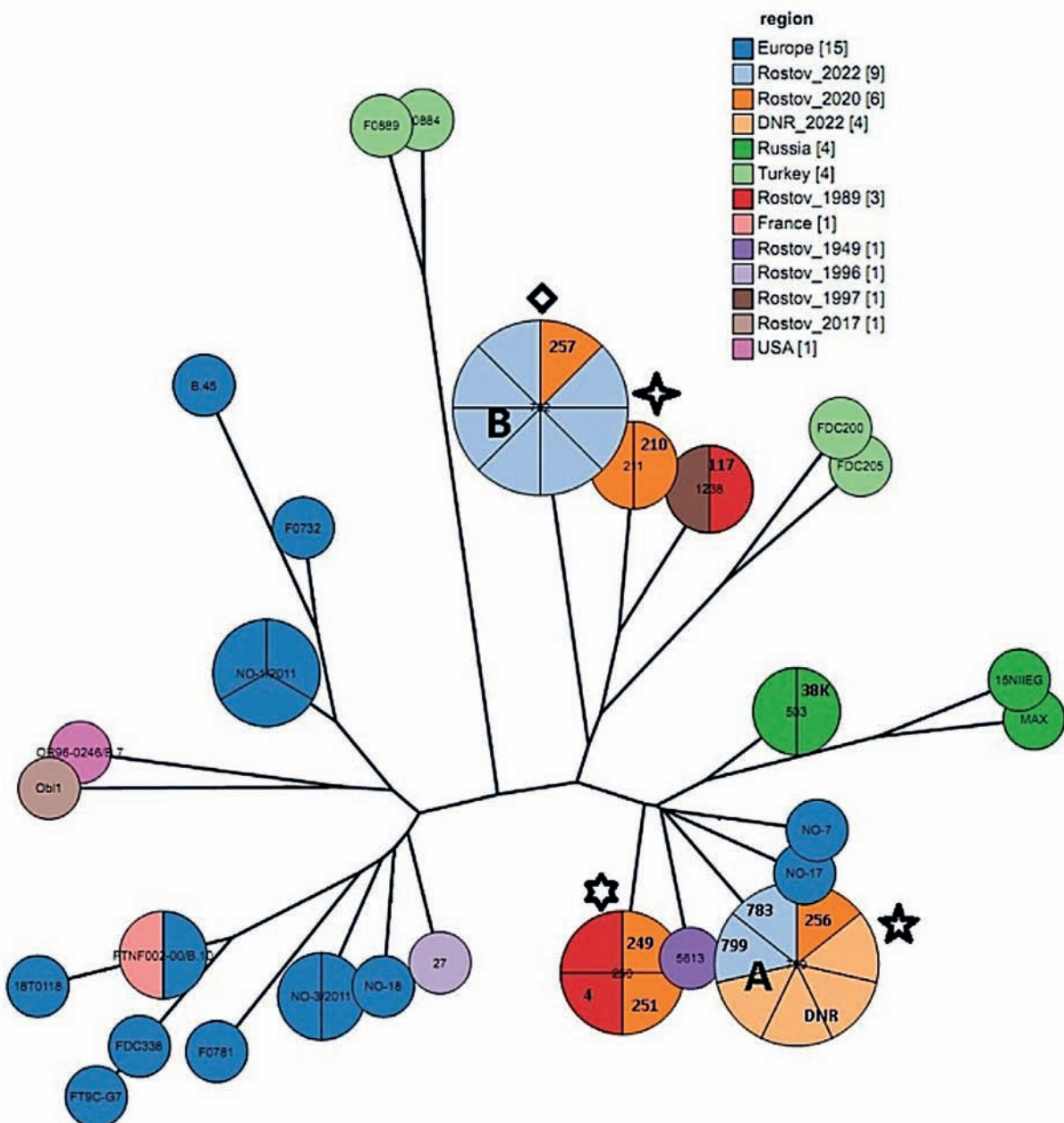


Рис. 3. Филогенетическое дерево VNTR-генотипов европейских и российских штаммов *F. tularensis*, построенное по алгоритму NJ. Символы обозначают общие генотипы штаммов 2020 и 2022–2023 гг.
Fig. 3. Phylogenetic tree of VNTR-genotypes of European and Russian strains of *F. tularensis* built using the NJ algorithm. The symbols indicate the common genotypes of the 2020 and 2022–2023 strains.



Рис. 4. Карта распределения VNTR-генотипов штаммов *F. tularensis*.
Fig. 4. Distribution map of VNTR-genotypes of *F. tularensis* strains.

Для филогенетического анализа популяций различных микроорганизмов успешно применяются как SNP-, так и VNTR-методы (рис. 4). Так, например, для популяций *Bacillus anthracis* применяется комбинация SNP- и VNTR-маркеров [18, 19], включающая набор из 14 диагностически значимых SNP (canSNP) на первом этапе. С другой стороны, при анализе вспышки заболевания, вызванного бактериями *Pseudomonas aeruginosa*, проведенном с применением методов VNTR-типирования и полногеномного секвенирования, авторы пришли к выводу о целесообразности применения на первом этапе простого и быстрого метода MLVA с последующим секвенированием изолятов с одинаковым MLVA-профилем [20].

В то же время данные по сравнительному изучению результатов совместного VNTR-и SNP-типирования штаммов *F. tularensis* весьма немногочисленны. В работе [21] показано, что кластеризация по VNTR-генотипам согласуется с таковой по SNP-генотипам, при этом метод SNP обладает большей разрешающей способностью – 45 изученных штаммов представлены 23 SN-генотипами и лишь 6 VNTR-генотипами. Только лишь в одном случае один SNP-генотип делится на два VNTR-генотипа. Шевцовым с соавт. [22] представлены результаты генотипирования 39 штаммов *F. tularensis* subsp. *holarctica*, выделенных в Казахстане, включая вакцинный штамм 15 НИИЭГ, с использованием MLVA, canSNP и wgSNP. Генотипирование MLVA проводили по классической схеме генотипирования, включающей 25 локусов, из них только 5 локусов оказались вариабельными для данной популяции. В

набор были включены еще два VNTR-локуса, обнаруженные авторами *in silico*. Изученные штаммы представлены 19 MLVA-генотипами, причем кластеризация по MLVA-генотипам коррелирует с таковой для canSNP и wgSNP-типирования и разрешающая способность методов примерно одинакова. Анализ ридов длиной 300 п.н. позволил корректно идентифицировать все VNTR-аллели у 39 изученных штаммов. Авторы делают вывод о том, что ПЦР-анализ с использованием MLVA7-набора совместим с анализом WGS *in silico* и должен облегчить выбор штаммов для секвенирования и контроля качества идентичности штаммов.

Еще одним доводом в пользу примененного набора VNTR-локусов служат данные Нарышкиной с соавт. [23], полученные при полногеномном секвенировании вакцинного штамма 15 НИИЭГ. Для проведения филогенетического анализа из базы данных NCBI GenBank были взяты 229 геномов *F. tularensis*. В итоге в анализируемой группе, состоящей из 230 геномов *F. tularensis*, всего выявлено 31 294 коровых SNP. Филогенетический анализ показал, что максимально близко к исследуемому штамму расположены два варианта штамма *F. tularensis* LVS. Следующим по филогенетической близости к штамму *F. tularensis* 15 НИИЭГ оказался штамм *F. tularensis* ssp. *holarctica* MAX, Россия, 1928 г. Далее следует группа из трех штаммов *F. tularensis* ssp. *holarctica*, выделенных в 2011 г. в Норвегии от больных людей, – NO17, NO18 и NO7, отличающихся от штамма 15 НИИЭГ на 23, 23 и 24 коровых SNPs соответственно. Наиболее удаленным по филогенетическому родству от

штамма 15 НИИЭГ из рассматриваемой группы является штамм 503, Россия, 1939 г., отличающийся от него на 29 коровых SNP. В нашем исследовании наблюдается практически то же распределение родственных штаммов (рис. 3).

Таким образом, предлагаемый нами набор из 5 VNTR-локусов при филогенетическом анализе дает сходный профиль кластеризации по сравнению с данными, полученными при использовании разных наборов SNP.

Проведено полногеномное секвенирование 16 штаммов *F. tularensis*, выделенных в трех районах РО (Целинский, Ремонтненский, Неклиновский) и одном районе ДНР (Новоазовский). Использование схемы «канонических SNP» показало, что они относятся к двум разным генотипам – В.170 и В.203. Расширенное генотипирование с использованием 6626 SNP позволило подтвердить разделение штаммов 2022–2023 гг. на два кластера – А и В.

Анализ результатов VNTR-генотипирования подтвердил разделение 16 штаммов 2022–2023 гг. на два разных VNTR-генотипа (А и В), соответствующих кластерам, выявленным при SNP-типировании.

Штаммы *F. tularensis*, выделенные в ДНР (Новоазовский район), оказались генетически близки штаммам, изолированным на территории трех районов РО, что позволяет подтвердить гипотезу о существовании трансграничного очага туляремии.

Простой и быстрый метод VNTR является методом выбора для проведения филогенетического анализа. Преимуществами метода являются возможность генотипирования возбудителя непосредственно в полевом материале без выделения чистой культуры, а также отсутствие необходимости в выполнении трудоемкой и затратной процедуры полногеномного секвенирования.

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

1. Ковалев ЕВ, Карпущенко ГВ, Швагер ММ, Полонский АВ, Сидельников ВВ, Гончаров АЮ, и др. Особенности распространения туляреминой инфекции в Ростовской области. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2017;16(6):37-40. DOI: 10.31631/2073-3046-2017-16-6-37-40

2. Мокриевич АН, Кравченко ТБ, Фирстова ВВ, Титарева ГМ, Дятлов ИА, Тимофеев ВС. Туляремия: состояние проблемы и методы исследования. Оболонск, М.: Династия, 2019.

3. Кудрявцева ТЮ, Мокриевич АН. Туляремия в мире. Инфекция и иммунитет. 2021;11(2):249-264. DOI: 10.15789/2220-7619-TTW-1380

4. Добровольский ОП, Пичурина НЛ, Орехов ИВ, Полонский АВ, Гончаров АЮ, и др. Сравнительный анализ биоценотической структуры носителей возбудителя туляремии в очагах степного типа приграничных территорий Ростовской области. Пест-Менеджмент. 2020;3:13-19. DOI: 10.25732/pm.2020.115.3.002
5. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сип, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам. Методические указания МУК 4.2.2495–09. М., 2009.
6. Эпидемиологический надзор за туляремией. Методические указания МУ 3.1.2007-05. М., 2005.
7. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol. 2012 May;19(5):455-77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021
8. Larkeryd A, Myrtennas K, Karlsson E, Dwibedi CK, Forsman M, Larsson P, et al. CanSNPer: a hierarchical genotype classifier of clonal pathogens. Bioinformatics. 2014 Jun 15;30(12):1762-4. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu113
9. Водопьянов АС, Писанов РВ, Водопьянов СО, Мишанькин БН, Олейников ИП, Кругликов ВД, и др. Молекулярная эпидемиология *Vibrio cholerae* – разработка алгоритма анализа данных полногеномного секвенирования. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2016;21(3):146-52.
10. Zhou Z, Alikhan NF, Sergeant MJ, Luhmann N, Vaz C, Francisco AP, et al. GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. Genome Res. 2018 Sep;28(9):1395-1404. DOI: 10.1101/gr.232397.117
11. O'Sullivan MV, Sintchenko V, Gilbert GL. Software for selecting the most informative sets of genomic loci for multi-target microbial typing. BMC Bioinformatics. 2013 May 1;14:148. DOI: 10.1186/1471-2105-14-148
12. Родионова ИВ. Дифференциация географических рас *Francisella tularensis* на основании активности цитруллинуреидазы. Лабораторное дело. 1970;1:42-3.
13. Цимбалистова МВ, Павлович НВ. Фосфатазная активность у представителей рода *Francisella*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1998;1:10-3.
14. Цимбалистова МВ, Павлович НВ. Особенности формирования устойчивости *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* к β-лактамам антибиотикам. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014;1:3-8.
15. Сорокин ВМ, Водопьянов АС, Павлович РВ, Цимбалистова МВ. Способ определения подвидов *Francisella tularensis* методом мультипраймажной ПЦР. RU 2 765 495 С1 от 2022.01.31.
16. Кудрявцева ТЮ, Мокриевич АН. Молекулярно-генетические основы различий подвидов возбудителя туляремии и типирования штаммов *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2022;40(1):12-20. DOI: 10.17116/molgen20224001112
17. Цимбалистова МВ, Сорокин ВМ, Аронова НВ, Анисимова АС, Пичурина НЛ, Пасюкова НИ, и др. Биологические свойства и генетическая характеристика штаммов *Francisella tularensis*, изолированных на территории Ростовской области в 2020 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2021;3:134-140.
18. Timofeev VS, Bakhteeva IV, Dyatlov IA. Genotyping of *Bacillus anthracis* and closely related microorganisms. Russ J Genet. 2018;54(1):1-11. DOI: 10.1134/S1022795418010118
19. Анисимова ЕА, Фахрутдинов НА, Миргазов ДА, Додонова ЕА, Елизарова ИА, Горбунова МЕ, Хаммадов НИ, Зайнуллин ЛИ, Осянин КА. Дифференциация штаммов *Bacillus anthracis* на основе SNP- и VNTR-полиморфизма геномов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022;26(6):560-567. DOI 10.18699/VJGB-22-68
20. Bidet P, Birgy A, Brethon B, Dalle JH, Mariani-Kurkdjian P, Courroux C, et al. Epidemiological investigation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates including multidrug-resistant serogroup O12 isolates, by use of a rapid and simplified multiple-locus variable-number of tandem repeats analysis and whole genome sequencing. J Hosp Infect. 2022 Dec;130:56-62. DOI: 10.1016/j.jhin.2022.09.012
21. Myrtennas K, Escudero R, Zaballos Á, González-Martín-Niño R, Gyuranecz M, Johansson A. Genetic Traces of the *Francisella tularensis* Colonization of Spain,

- 1998–2020. *Microorganisms*. 2020 Nov 14;8(11):1784. DOI: 10.3390/microorganisms8111784
22. Shevtsov V, Kairzhanova A, Shevtsov A, Shustov A, Kalendar R, Abdrakhmanov S, et al. Genetic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in Kazakhstan. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021 May 17;15(5):e0009419. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009419
23. Нарышкина ЕА, Краснов ЯМ, Альхова ЖВ, Баданин ДВ, Осин АВ, Ляшова ОЮ, и др. Полногеномное секвенирование и филогенетический анализ вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. Проблемы особо опасных инфекций. 2020;2:91–97. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-91-97
16. Kudryavtseva TYu, Mokrievich AN. Molecular and genetic bases of differences in subspecies of the causative agent of tularemia and typing of strains of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2022;40(1):12–20. DOI: 10.17116/molgen20224001112 (In Russian).
17. Tsimbalistova MV, Sorokin VM, Aronova NV, Anisimova AS, Pichurina NL, Pasyukova NI, et al. Biological properties and genetic characteristics of *Francisella tularensis* strains isolated on the territory Rostov region in 2020. *Problems of Especially Dangerous Infections*. 2021;3:134–140. (In Russian).
18. Timofeev VS, Bakhteeva IV, Dyatlov IA. Genotyping of *Bacillus anthracis* and closely related microorganisms. *Russ J Genet*. 2018;54(1):1–11. DOI: 10.1134/S1022795418010118
19. Anisimova EA, Fakhrutdinov NA, Mirgazov DA, Dodonova EA, Elizarova IA, Gorbunova M, et al. *Bacillus anthracis* strain differentiation based on SNP and VNTR loci. *Vavilovskii Zhurnal Genet Selektii*. 2022 Oct;26(6):560–567. DOI: 10.18699/VJGB-22-68
20. Bidet P, Birgy A, Brethon B, Dalle JH, Mariani-Kurkdjian P, Courroux C, et al. Epidemiological investigation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates including multidrug-resistant serogroup O12 isolates, by use of a rapid and simplified multiple-locus variable-number of tandem repeats analysis and whole genome sequencing. *J Hosp Infect*. 2022 Dec;130:56–62. DOI: 10.1016/j.jhin.2022.09.012
21. Myrtenäs K, Escudero R, Zaballos Á, González-Martín-Niño R, Gyuranecz M, Johansson A. Genetic Traces of the *Francisella tularensis* Colonization of Spain, 1998–2020. *Microorganisms*. 2020 Nov 14;8(11):1784. DOI: 10.3390/microorganisms8111784
22. Shevtsov V, Kairzhanova A, Shevtsov A, Shustov A, Kalendar R, Abdrakhmanov S, et al. Genetic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in Kazakhstan. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021 May 17;15(5):e0009419. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009419
23. Naryshkina EA, Krasnov YaM, Alkhova ZhV, Badanin DV, Osin AV, Lyashova OYu, et al. Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of the vaccine strain *Francisella tularensis* 15 NIEG. *Problems of Especially Dangerous Infections*. 2020;2:91–97. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-91-97 (In Russian).
1. Kovalev EV, Karpuschenko GV, Schwager MM, Polonsky AV, Sidelnikov VV, Goncharov AYu, et al. Features of the spread of tularemia infection in the Rostov region. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2017;16(6):37–40. DOI: 10.31631/2073-3046-2017-16-6-37-40 (In Russian).
2. Mokrievich AN, Kravchenko TB, Firstova VV, Titareva GM, Dyatlov IA, Timofeev VS. Tularemia: state of the problem and research methods. *Obolensk, M.: Dynast Publ.*, 2019. (In Russian).
3. Kudryavtseva TYu, Mokrievich AN. Tularemia in the world. *Infection and immunity*. 2021;11(2):249–264. DOI: 10.15789/2220-7619-TTW-1380 (In Russian).
4. Dobrovolsky OP, Pichurina NL, Orekhov IV, Polonsky AV, Goncharov AYu, et al. Comparative analysis of biocenotic structure of tularemia agents in natural foci of steppe type in boundary territories of Rostov region. *Pest Management*. 2020;3:13–19. DOI: 10.25732/pm.2020.115.3.002 (In Russian).
5. Determination of the sensitivity of pathogens of dangerous bacterial infections (plague, anthrax, cholera, tularemia, brucellosis, glanders, melioidosis) to antibacterial drugs. *Guidelines MUK 4.2.2495-09. M.*, 2009. (In Russian).
6. Epidemiological surveillance of tularemia. *Guidelines MU 3.1.2007-05. M.*, 2005. (In Russian).
7. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012 May;19(5):455–77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021
8. Larkeryd A, Myrtenäs K, Karlsson E, Dwibedi CK, Forsman M, Larsson P, et al. CanSNPer: a hierarchical genotype classifier of clonal pathogens. *Bioinformatics*. 2014 Jun 15;30(12):1762–4. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu113
9. Vodopyanov AS, Pisanov RV, Vodopyanov SO, Mishankin BN, Oleinikov IP, Kruglikov VD, et al. Molecular Epidemiology of *Vibrio cholerae* – Development of an Algorithm for Whole Genome Sequencing Data Analysis. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2016;21(3):146–52. (In Russian).
10. Zhou Z, Alikhan NF, Sergeant MJ, Luhmann N, Vaz C, Francisco AP, et al. GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. *Genome Res*. 2018 Sep;28(9):1395–1404. DOI: 10.1101/gr.232397.117
11. O'Sullivan MV, Sintchenko V, Gilbert GL. Software for selecting the most informative sets of genomic loci for multi-target microbial typing. *BMC Bioinformatics*. 2013 May 1;14:148. DOI: 10.1186/1471-2105-14-148
12. Rodionova IV. Differentiation of geographical races of *Francisella tularensis* based on citrulline ureidase activity. *Laboratory Work*. 1970;1:42–3. (In Russian).
13. Tsimbalistova MV, Pavlovich NV. Phosphatase activity in representatives of the genus *Francisella*. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1998;1:10–3. (In Russian).
14. Tsimbalistova MV, Pavlovich NV. Features of resistance formation in *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* to β -lactam antibiotics. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2014;1:3–8. (In Russian).
15. Sorokin VM, Vodopyanov AS, Pavlovich RV, Tsimbalistova MV. Method for determining subspecies of *Francisella tularensis* by multiprimer PCR. *RU 2 765 495 C1* of 2022.01.31. (In Russian).

Информация о соавторах:

Павлович Наталья Владимировна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник, и.о. заведующего отделом природноочаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Цимбалистова Марина Викторовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории природноочаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Водопьянов Алексей Сергеевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природноочаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Писанов Руслан Вячеславович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии природноочаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Носков Алексей Кимович, кандидат медицинских наук, директор ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Natalia V. Pavlovich, MD, PhD, DSc, Chief Researcher, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

Marina V. Tsimbalistova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

Alexey S. Vodopyanov, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

Ruslan V. Pisanov, PhD in Biological Sciences, Chief Researcher, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

Alexey K. Noskov, PhD, MD, Director of Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

Получение и оценка качества полирибозилрибитолфосфата *Haemophilus influenzae* типа b – основного компонента вакцины против гемофильной инфекции

С.В.Коробова¹, П.А.Стряхнин¹, И.Ю.Курбатова¹, И.А.Казаков², Н.А.Развальяева¹, И.В.Анкудинов¹, Т.В.Ганчо¹, В.А.Ледов¹, П.Г.Апарин¹

¹ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация;

²ООО «Гритвак», Москва, Российская Федерация

Гемофильная инфекция, вызываемая грамотрицательной бактерией *Haemophilus influenzae* серотипа b, – часто встречающееся на территории России заболевание, характеризующееся серьезными осложнениями и высокой летальностью у детей. Вакцинация – основное средство, предотвращающее распространение заболевания. Эпитопы, ответственные за образование протективных антител, располагаются на бактериальном капсульном полисахариде полирибозилрибитолфосфат (ПРФ), который является основным вакцинным антигеном.

Целью работы было определение оптимальных способов очистки ПРФ и методов оценки его качества. ПРФ получали многоступенчатой очисткой цетавлоновым методом. Для контроля качества продуктов на разных стадиях получения использованы методы высокоэффективной жидкостной хроматографии и ядерно-магнитного резонанса. Конечный продукт исследовали также методами, утвержденными в Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) XIV пересмотра по показателям: содержание белка, нуклеиновых кислот, рибозы, специфическая активность, пирогенность, подлинность. Подтверждена структура, антигенные характеристики и серологическая активность ПРФ из *H. influenzae* серотипа b. Отработаны методы контроля технологической цепочки выделения полисахарида ПРФ. Получаемый продукт характеризуется высокой степенью очистки и сохранностью антигенных детерминант и может быть использован для конъюгации с белком-носителем для производства полноценного вакцинного препарата против гемофильной инфекции у детей. Показана возможность использования метода ядерно-магнитного резонанса для определения подлинности ПРФ, что позволяет заменить иммунохимический метод анализа, предлагаемый ГФ РФ XIV, на физико-химический.

Ключевые слова: *Haemophilus influenzae* тип b, полирибозилрибитолфосфат, высокоэффективная жидкостная хроматография, ядерно-магнитный резонанс, вакцина

Для цитирования: Коробова С.В., Стряхнин П.А., Курбатова И.Ю., Казаков И.А., Развальяева Н.А., Анкудинов И.В., Ганчо Т.В., Ледов В.А., Апарин П.Г. Получение и оценка качества полирибозил-рибитол-фосфата *Haemophilus influenzae* типа b – основного компонента вакцины против гемофильной инфекции. Бактериология. 2023; 8(3): 75–82. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-75-82

Development and quality evaluation of the *Haemophilus influenzae* type b polyribozyl-ribitol-phosphate: the main component of the vaccine against hemophilian infection

S.V.Korobova¹, P.A.Stryakhnin¹, I.Yu.Kurbatova¹, I.A.Kazakov², N.A.Razvalyayeva¹, I.V.Ankudinov¹, T.V.Gancho¹, V.A.Ledov¹, P.G.Aparin¹

¹FBSI SRC Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation;

²Gritvak LLC, Moscow, Russian Federation

Disease caused by the gram-negative bacterium *Haemophilus influenzae* of serotype b is a widespread in a territory of the Russian Federation. It is characterized by serious complications and high mortality in children. Vaccination is the main means of preventing the spread of the disease. The epitopes responsible for the formation of protective antibodies are located on the bacterial capsular polysaccharide polyribozyl-ribitol-phosphate (PRP), the main vaccine antigen.

Для корреспонденции:

Коробова Светлана Вячеславовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории полисахаридных вакцин ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России

Адрес: 115522, Москва, Каширское шоссе, 24
Телефон: (499) 618-71-56

Статья поступила 08.09.2023, принята к печати 29.09.2023

For correspondence:

Svetlana V. Korobova, PhD, senior scientist, laboratory of polysaccharide vaccines, SRC Institute of Immunology FMBA of Russia

Address: 24 Kashirskoye shosse, Moscow, 115522, Russian Federation
Phone: (499) 618-71-56

The article was received 08.09.2023, accepted for publication 29.09.2023

Goals of the work is determination of the optimal methods of PRP purification and methods to control its quality. PRP was obtained by multi-stage purification by the cetavlon method. HPLC and NMR methods were used to control the quality of products at different stages of production. The final product was also examined by methods approved in Ph RF14: protein, nucleic acids, ribose content, specific activity, pyrogenicity, authenticity. The substance meets all the requirements prescribed in Ph RF 14 only after cetavlon precipitation. It does not contain impurities, retains antigenic activity, apyrogenic. The use of HPLC and proton NMR methods at different stages of the substance purification provides picture about the preservation of its structure and purity. The structure, antigenic characteristics and serological activity of PRF from *H. influenzae* serotype b were confirmed. Methods for monitoring the technological chain of PRF polysaccharide isolation have been developed. The resulting product is characterized by a high degree of purification and preservation of antigenic determinants. It can be used for conjugation with a carrier protein for the production of a full-fledged vaccine. The possibility of using NMR method to determine the PRP authenticity is shown. It makes possible to replace the immunochemical method proposed by Ph RF 14 with a physical and chemical analysis method.

Key words: *Haemophilus influenzae* type b, polyribosylribitol phosphate, high-performance liquid chromatography, nuclear magnetic resonance, vaccine

For citation: Korobova S.V., Stryakhnin P.A., Kurbatova I.Yu., Kazakov I.A., Razvalyayeva N.A., Ankudinov I.V., Gancho T.V., Ledov V.A., Aparin P.G. Development and quality evaluation of the *Haemophilus influenzae* type b polyribozil-ribitol-phosphate: the main component of the vaccine against hemophilian infection. Bacteriology. 2023; 8(3): 75–82. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-75-82

Вакцинация является основным средством, предотвращающим распространение инфекционных болезней. Среди них особое место занимает гемофильная инфекция [1]. Возбудитель заболевания – грамотрицательная бактерия *Haemophilus influenzae* серотипа b, которая является причиной серьезных инвазивных заболеваний у детей, таких как менингит, септический артрит, орбитальный целлюлит, эпиглоттит, бактериемия. Кроме того, она является частой причиной летальных исходов у детей [2]. Следует отметить, что на территории России гемофильная инфекция – часто встречающееся заболевание, ее показатели характеризуются региональными различиями и варьируют при менингите гемофильной этиологии от 5 до 15, а при гемофильной пневмонии – до 150 на 100 тыс. детей первых 5 лет жизни [3]. Наиболее восприимчивыми являются дети от 3 мес. до 5 лет. У новорожденных обнаруживают материнские антитела, защищающие их от гемофильной инфекции [4]. Для контроля распространения болезни в России вакцинация против гемофильной инфекции включена в национальный календарь прививок начиная с трехмесячного возраста [5]. Используемые для этих целей вакцины в основном производятся за рубежом. Препаратом для профилактики гемофильной инфекции, производимым на территории Российской Федерации, является вакцина гемофильная тип b полисахаридная конъюгированная лиофилизированная (производитель ФГУН «РостовНИИМП» Роспотребнадзора). Поэтому для более полного удовлетворения потребностей здравоохранения, в целях импортозамещения и ухода от зависимости от зарубежных производителей разработка производства российских вакцин полного цикла является приоритетной задачей отечественной фарминдустрии.

Установлено, что антитела к капсульному полисахариду (КПС) бактерии *H. influenzae* (полирибозилрибитолфосфат (ПРФ)) обладают защитными свойствами [6]. На его основе созданы все существующие вакцинные препараты. Очищенные полисахариды относятся к так называемым Т-независимым антигенам. Иммунный ответ на них развивается без участия Т-клеток. Они являются слабыми иммуногенами и не индуцируют у детей образования протективного иммунитета. Это обусловлено незрелостью у детей до 18 мес. В-клеток маргинальной зоны и меньшим количеством CD27⁺ В-клеток памяти, поскольку В-клетки марги-

нальной зоны селезенки являются основной субпопуляцией, реагирующей на антиген [7, 8]. Поэтому для увеличения иммуногенности полисахариды конъюгируют с белком-носителем – столбнячным токсидом, наружным белком мембраны *Neisseria meningitidis*; CRM197 – нетоксичным производным дифтерийного токсина, содержащего замену глицина на глутаминовую кислоту в положении 52. Доставка полисахарида в конъюгированной с белком форме вызывает развитие Т-зависимого иммунного ответа. Конъюгат полисахарида с белком захватывается антиген-представляющими клетками, процессируется и представляется Т-клеткам. Активация антиген-специфических Т-клеток, в свою очередь, приводит к образованию В-клеток памяти, созреванию аффинности антител и продукции антител класса IgG1 и IgG3 [9, 10].

Таким образом, на бактериальном полисахариде ПРФ располагаются эпитопы, ответственные за образование протективных антител. Белок-носитель отвечает лишь за переключение иммунного ответа с Т-независимого на Т-зависимый. Поэтому эффективность вакцинного препарата во многом определяется качеством полисахарида ПРФ: его чистотой, сохранностью антигенных детерминант. Предприятием ООО «Гритвак» совместно с ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России разрабатывается вакцина против гемофильной инфекции на основе конъюгата капсульного полисахарида ПРФ с белком CRM197.

Целью данной работы являлось определение оптимальных способов очистки ПРФ бактерии *H. influenzae* серотипа b и методов оценки его качества.

Методы

Культивирование *H. influenzae* типа b. Штамм *H. influenzae* 267 [11] перед выращиванием в ферментере рассевали на твердую питательную среду (сердечно-мозговой бульон, 4 мг/л НАД и 10 мг/л гемина) для контроля морфологических свойств и чистоты штамма. Затем культуру с твердой питательной среды смывали в колбу с жидкой питательной средой (350 мл) на основе аминокислот. Посевную культуру растили 10–12 ч в термостате при 37°C и проводили засев промышленного ферментера марки «АНКУМ» (рабочий объем 10 л). После засева *H. influenzae* определяли оптиче-

скую плотность среды в ферментере с помощью фотометра «КФК-3-01» при длине волны 530 нм. Подлинность и чистоту инокулята подтверждали агглютинацией со специфической антисывороткой и окрашиванием по Граму.

Очистка КПС *H. influenzae*

Первичная очистка. Культуральную жидкость центрифугировали при 12 000 g, 7°C в течение 60 мин (Beckman Avanti). Супернатант концентрировали с использованием тангенциальных ультрафильтрационных мембран («Владисарт» 50 кДа).

Обработка ферментами. Добавляли фермент эндонуклеазу, 1 единица на 10 мл раствора, и инкубировали в течение 6 ч при 37°C и 170 об./мин на магнитной мешалке. Затем добавляли проназу Е, трипсин (тип I) и наргазу по 1 ед. на 10 мл раствора. Между добавлением каждой последующей протеазы выдерживали двухчасовую паузу. Проводили ультрафильтрацию на мембране.

Осаждение цетавлоном проводили по методу J.Кюо [12] с модификацией.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). 0,1 мг очищенного КПС *H. influenzae* типа b растворяли в пробирке в 1 мл фосфатно-солевого буфера (0,2 М, рН ~7,4), перемешивали с помощью орбитального шейкера в течение 10 мин, затем с целью удаления возможных механических примесей подвергали центрифугированию на настольной центрифуге (1000 об./мин). 100 мкл супернатанта вводили с помощью шприца Hamilton в петлю хроматографа Agilent с рефрактометрическим детектором (скорость потока – 0,5 мл/мин, колонка – Shodex G-3000). Калибровочную прямую строили с помощью декстранов 270, 70, 50, 10, 5 кДа.

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР). Спектры ЯМР были сняты на ЯМР-спектрометрах Bruker AM500 и Varian Unity 500 МГц при температуре образца 30°C. Оптимизированные условия для анализа: 2–3 мг полисахарида трижды лиофилизировали из 0,4 мл 99,9%-й дейтерированной воды (Apollo Scientific), растворяли в 0,7 мл той же дейтерированной воды и вводили в 5-миллиметровую ЯМР-пробирку. Спектр получали при температуре образца 30°C. 64 тыс. точек данных собираются в спектральной ширине 16 ppm с временем повторного цикла 6,1 с. Спектры взвешивали с уширением линии 0,2 Гц, преобразовывали по Фурье и готовили серию стандартных графиков

Определение рибозы проводили согласно общей фармакопейной статье (ОФС 1.2.3.0019.15 ГФ 14 РФ) с орциновым реагентом [13].

Определение содержания белка проводили по методу Бредфорда, согласно ОФС 1.2.3.0012.15 ГФ14 РФ [13].

Определение содержания нуклеиновых кислот проводили по методу Спирина, согласно ОФС.1.7.2.0018.15 ГФ14 РФ [13].

Пирогенность оценивали согласно ОФС.1.2.4.00105.15 ГФ14 РФ. Животному вводили 1 мкг ПРФ на 1 кг/живого веса [13].

Подлинность. Выполняется на коммерческих наборах Wellcogen™ *H. influenzae* b Rapid Latex Agglutination Test, согласно приложенной инструкции.

Определение специфической активности. На твердую фазу сорбировали конъюгат ПРФ с бычьим сывороточным

альбумином (БСА) в концентрации 1 мкг/мл (по ПРФ) в карбонат-бакарбонатном буферном растворе, при комнатной температуре 12–18 ч. По окончании инкубации планшеты отмывали в фосфатно-солевом буферном растворе, содержащем 0,05% Tween 20 (ФСБ-Т). Вносили последовательное разведение ПРФ (от 100 до 0,75 мкг/мл) совместно с сывороткой человека, содержащей антитела к ПРФ (09/222, NIBSC), в растворе 1% БСА ФСБ-Т. Инкубировали 1 ч при 37°C. Отмывали планшет ФСБ-Т. Вносили конъюгат антител кролика к IgG человека, меченных пероксидазой («Имтек»). Инкубировали 1 ч при 37°C, по окончании инкубации отмывали планшет ФСБ-Т. Вносили субстрат – 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорид (ТМБ). Через 15 мин реакцию останавливали 10%-м раствором серной кислоты. Результаты учитывали при 450 нм.

Результаты исследования

Технологическая цепочка получения ПРФ

Получение бактериальной массы *H. influenzae* тип b.

Очистка КПС *H. influenzae* тип b.

2.1. Первичная очистка (ультрафильтрация) – получение супернатанта бактериальной клеточной среды.

2.2. Обработка ферментами – удаление белков и нуклеиновых кислот.

2.3. Осаждение цетавлоном – получение чистого ПРФ.

3. Контроль качества ПРФ.

Анализ качества образцов ПРФ на разных стадиях

очистки методом ВЭЖХ. Проведено исследование трех образцов ПРФ *H. influenzae* типа b, полученных после каждого этапа очистки. Первый образец – субстанция после ультрафильтрации, второй – субстанция после ферментативной обработки, третий – субстанция после осаждения цетавлоном (конечный продукт). Для удаления солей и прочих компонентов, добавленных в процессе очистки, субстанции диализовали в деионизованной воде и лиофилизировали. Каждый образец ПРФ *H. influenzae* типа b растворяли в пробирке в ФСБ, затем с целью удаления возможных механических примесей вещества центрифугировали. Наличие примесей в каждом образце супернатантов было исследовано в ВЭЖХ на Shodex G-3000. Калибровочную прямую строили с помощью декстранов 270, 70, 50, 10, 5 кДа.

Хроматография полученных образцов показала, что первый образец (вещество после ультрафильтрации) сильно загрязнен побочными низкомолекулярными соединениями, предположительно ЛПС, белками и нуклеиновыми кислотами. Образец при центрифугировании давал осадок. Сам образец (сухой лиофилизат) темно-коричневого цвета, что свидетельствует о возможной примеси хлорида гемина. Его молекулярная масса составляет ~100 кДа (рис. 1А).

Во втором образце (после обработки ферментами) количество примесей заметно уменьшилось. Образец при центрифугировании давал небольшой, но визуально определяемый осадок коричневого цвета, что свидетельствует о возможной примеси хлорида гемина. Его молекулярная масса составляет ~88 кДа (рис. 1Б).

Третий образец (после осаждения цетавлоном) не имел низкомолекулярных примесей, образец при центрифугировании не дает осадка. Сам образец (сухой лиофилизат) белого цвета, что свидетельствует об отсутствии примеси хлорида гемина. Его молекулярная масса составляет ~75 кДа. Пики

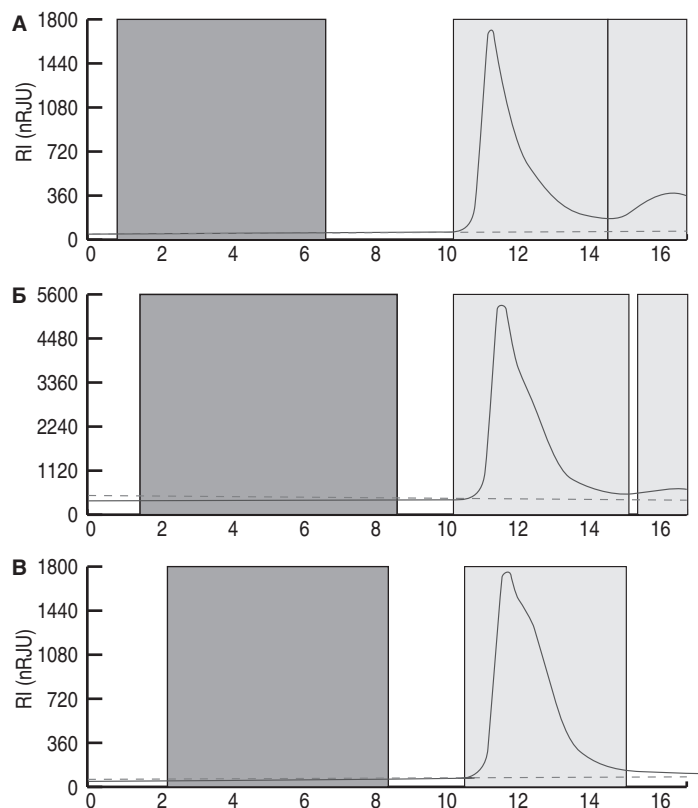


Рис. 1. Хроматограмма образца ПРФ *H. influenzae* типа b: после ультрафильтрации (А), после обработки ферментами (Б), после осаждения цетавлоном (В).
Fig. 1. Chromatogram of *H. influenzae* type b PRP sample: after ultrafiltration (A), after enzyme treatment (B), after precipitation with cetavlon (B).

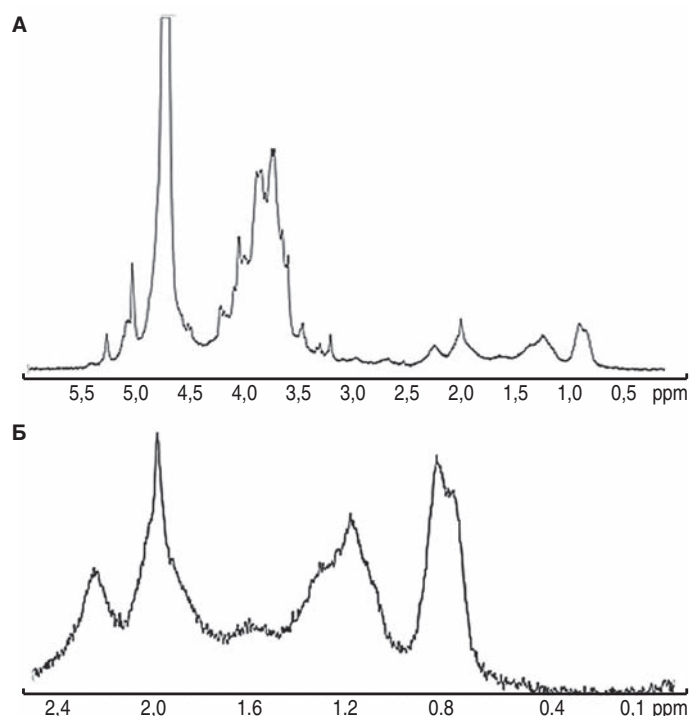


Рис. 2. Протонный ЯМР-спектр образца ПРФ *H. influenzae* типа b после ультрафильтрации: область 6 – 0 ppm (А), область 2,5 – 0 ppm (Б).
Fig. 2. Proton NMR spectrum of a *H. influenzae* type b PRP sample, after the ultrafiltration: region 6 – 0 ppm (A), region 2.5 – 0 ppm (B).

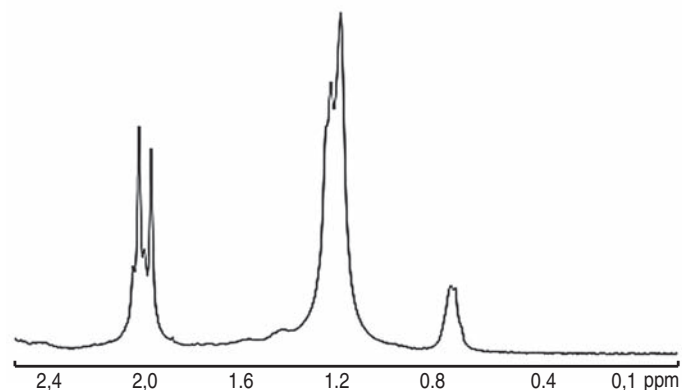


Рис. 3. Протонный ЯМР-спектр липополисахарида *H. influenzae* типа b, область 2,5 – 0 ppm.
Fig. 3. Proton NMR spectrum of *H. influenzae* type b lipopolysaccharide, region 2.5 – 0 ppm.

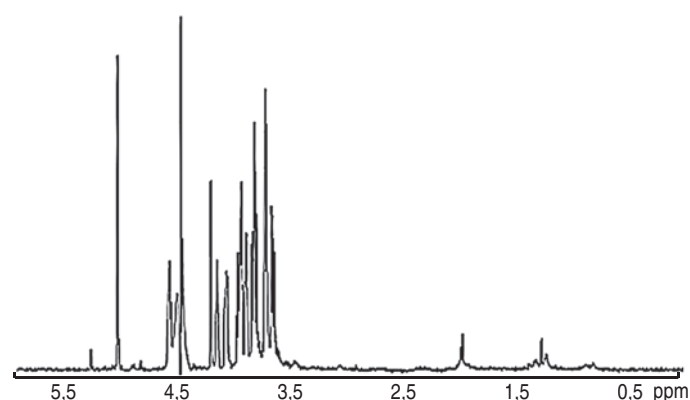


Рис. 4. Протонный ЯМР образца ПРФ *H. influenzae* типа b после обработки ферментами, область 6 – 0 ppm.
Fig. 4. Proton NMR of *H. influenzae* type b PRP sample after enzyme treatment, region 6 – 0 ppm.

после 14-й минуты отсутствуют, следовательно, образец не содержит низкомолекулярных примесей (рис. 1В).

Съемка и обработка протонных ЯМР-спектров трех образцов КПС *H. influenzae* типа b на различных стадиях очистки. На протонном спектре первого образца (после ультрафильтрации) (рис. 2А) можно наблюдать наличие аномерного протона в области 5.1 ppm, т.е. можно уверенно утверждать, что данный образец содержит в себе КПС *H. influenzae* типа b. Сам спектр имеет не лучшее «разрешение», или «качество», предположительно потому, что липополисахарид *H. Influenzae* типа b плохо растворяется в воде и «мешает» съемке спектра.

Липополисахарид *H. influenzae* типа b был выделен отдельно, и у него также был снят протонный спектр (рис. 3).

Увеличенная с помощью программы для обработки спектров область от 2,5 до 0 ppm (рис. 2Б) подтверждает, что одно из веществ, которое загрязняет образец ПРФ *H. influenzae* типа b, и есть липополисахарид *H. Influenzae* типа b.

На протонном спектре второго образца можно наблюдать наличие аномерного протона в области 5.1 ppm. Этот спектр лучшего качества по сравнению с первым ввиду удаления основной массы липополисахарида *H. influenzae* типа b. Тем не менее протонный спектр второго образца очевидно отличается от эталонного присутствием посторонних сигналов (рис. 4).

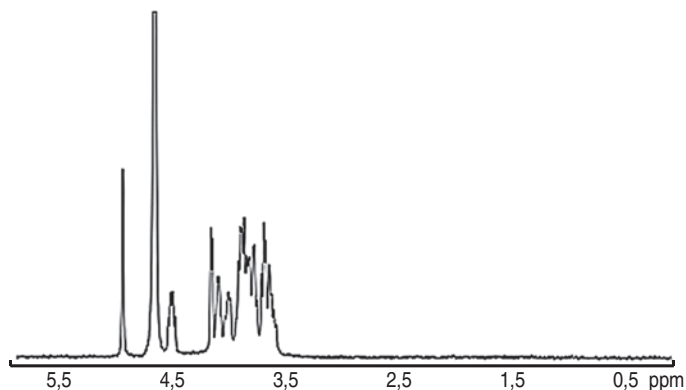


Рис. 5. Протонный ЯМР спектр образца ПРФ *H. influenzae* типа b после осаждения цетавлоном, область 6 – 0 ppm.
Fig. 5. Proton NMR spectrum of *H. influenzae* type b PRP sample after precipitation with cetavlon, region 6 – 0 ppm.

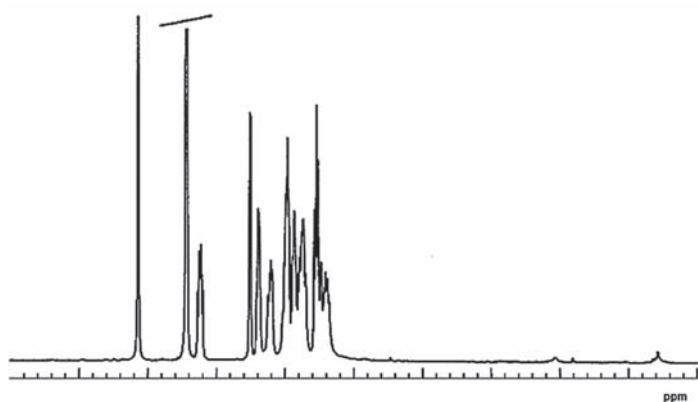


Рис. 6. Эталонный протонный ЯМР-спектр ПРФ *H. influenzae* типа b [14].
Fig. 6. Reference proton NMR spectrum of *H. influenzae* type b PRP [14].

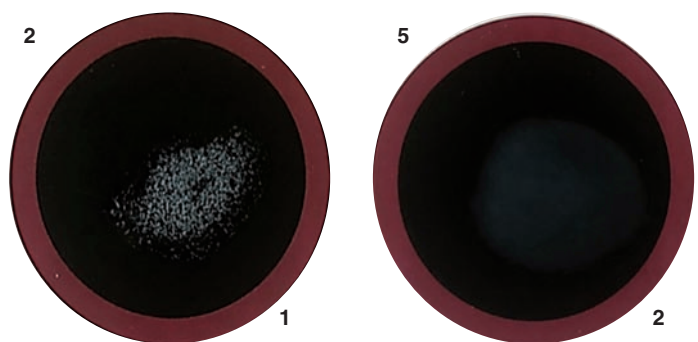


Рис. 7. Результаты реакции агглютинации ПРФ с латексными частицами с сорбированными антителами от 1) иммунных кроликов, 2) интактных кроликов. Набор Wellcogen™ *Haemophilus influenzae* b Rapid Latex Agglutination Test.
Fig. 7. Results of the PRP agglutination reaction with latex particles with adsorbed antibodies from 1) immune rabbits, 2) intact rabbits. Wellcogen™ *Haemophilus influenzae* b Rapid Latex Agglutination Test Kit.

На протонном спектре третьего образца (после осаждения цетавлоном) можно наблюдать наличие аномального протона в области 5.1 ppm (рис. 5). Спектр третьего образца идеально совпадает с эталонным спектром (рис. 6), т.е. можно уверенно утверждать, что данный образец содержит в себе КПС *H. influenzae* типа b.

Анализ очищенного ПРФ *H. influenzae* типа b.

Промежуточные продукты очистки ПРФ содержат большое количество примесей, что следует из результатов ВЭЖХ и ЯМР. Поэтому оценку качества ПРФ проводили только после его финальной очистки, согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) XIV пересмотра.

ПРФ представляет собой полимер, содержащий в своем составе моносахарид рибозу (5-D-ribitol-(1→1)-β-D-рибоза-3-фосфат) [15]. Для количественного определения ПРФ в конъюгате и оценки его качества проводят измерение рибозы. Рибоза составляет примерно 40–41% по весу одиночной повторяющейся цепи ПРФ Hib. Натриевая соль одного повторяющегося звена ПРФ имеет молекулярную массу 368 Да. В реакции Vial рибоза в виде пентозы реагирует с орциноловым реагентом в концентрированном растворе соляной кислоты и хлорида железа с образованием зеленого окрашивания [16, 17]. Эта реакция позволяет обнаружить 3 нмоль рибозы (или мономерного звена ПРФ). В качестве стандартна используется D-рибоза.

В 1 мг конечного продукта содержание рибозы составляло 406,7 мкг. Содержание ПРФ пересчитывается по формуле:

$$(Mr_{\text{ПРФ}}/Mr_{\text{рибозы}}) \times m(\text{полученное значение рибозы}) = (368,14/150,13) \times 406,7 = 997,3.$$

Наличие примесей белка и нуклеиновых кислот исследовалось стандартными методами, принятыми в ГФ РФ XIV: по Бредфорду (для белков) и Спирину (для нуклеиновых кислот). Примеси белков и нуклеиновых кислот в конечном продукте составляли <1% и <1% соответственно, что согласуется с требованиями ГФ РФ XIV.

О присутствии примесей в готовой форме ПРФ можно также судить в биологическом тесте – пирогенности. Подъем температуры у животных при введении свидетельствует о загрязненности вещества эндотоксинами. Суммарный подъем температуры при введении животным составлял 0,6°C, что не превышает порог в 1,2°C и указывает на апиогенность вещества.

Тест на подлинность ПРФ представляет собой положительную реакцию латекс-агглютинации. В основе этого теста лежит взаимодействие ПРФ-специфических антител (полученных от кролика), сорбированных на латексных шариках, и ПРФ с образованием агглютината. Данный тест выполнялся на коммерческом наборе. На рис. 7 представлен результат реакции с очищенным полисахаридом. О специфичности реакции свидетельствует отсутствие агглютинации с отрицательным контролем – латексными частицами с сорбированными антителами от неиммунных животных.

Специфическая активность показывает сохранность антигенных детерминант в препарате. Ее исследовали методом иммуноферментного анализа (ИФА) в формате торможения. На твердую фазу сорбировали конъюгат ПРФ *H. influenzae* типа b с БСА. Исследуемый образец в различных концентрациях инкубировали совместно с антителами к ПРФ. Для этого был использован стандартный образец – референсная сыворотка человека, содержащая антитела к ПРФ *H. influenzae* типа b, производства Государственного института биологических стандартов и контроля (Великобритания). Далее реакцию проявляли и снимали зна-

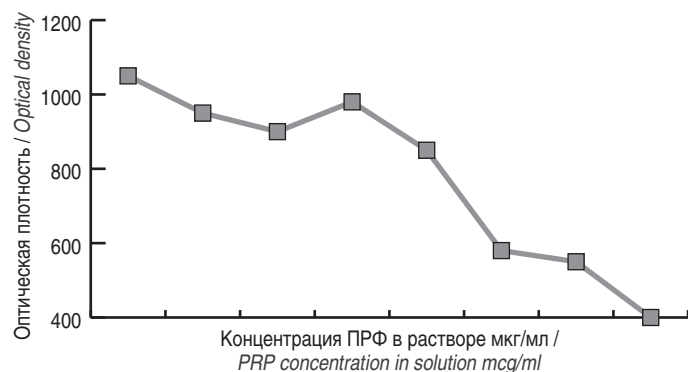


Рис. 8. Реакция торможения в ИФА ПРФ *H. influenzae* типа b со стандартной сывороткой человека, содержащей специфические антитела к *H. influenzae* типа b.

Fig. 8. Inhibition reaction in ELISA of *H. influenzae* type b PRP with standard human serum containing specific antibodies to *H. influenzae* type b.

чения оптической плотности (ОП). В данном тесте при уменьшении концентрации антигена в растворе специфические антитела начинают связываться с антигеном, сорбированным на твердой фазе, что приводит к возрастанию ОП. Как видно из рис. 8, с уменьшением концентрации ПРФ в растворе идет увеличение значений ОП, что говорит о специфическом взаимодействии антител с антигеном (ПРФ) в растворе.

Обсуждение

Получение ПРФ *H. influenzae* типа b, пригодного для производства вакцинных препаратов, – сложный многоступенчатый процесс. Вакцина против гемофильной инфекции применяется только у малолетних детей, поэтому ее безопасности уделяется особое внимание. ПРФ продуцируется бактериальными клетками в ростовую среду, из которой далее выделяется рядом последовательных этапов очистки, поэтому изначально ПРФ содержит большое количество примесей: компоненты ростовой среды, продукты жизнедеятельности бактерии, белки, нуклеиновые кислоты и т.п. Все эти вещества должны отсутствовать в конечном продукте, как небезопасные для человеческого организма.

Проведенные нами исследования показали, что для получения чистого, пригодного для производства вакцин ПРФ необходимы несколько этапов очистки. Оценка чистоты продуктов после начальных этапов очистки (ультрафильтрация и обработка ферментами) показала значительное присутствие в них примесей. Только после осаждения цетавлоном вещество удовлетворяло всем требованиям, предъявляемым в ГФ РФ XIV: оно не содержало примесей, сохраняло антигенную активность, т.е. не деградировало в процессе очистки и было апиrogenно.

Важными методами контроля ПРФ являются методы ВЭЖХ и протонного ЯМР. Использование этих методов на разных этапах очистки вещества дает представление не только о содержании или отсутствии в нем нежелательных примесей, но и о сохранности его структуры. С помощью ЯМР можно определять также подлинность вещества по совпадению протонного спектра образца и эталона. Согласно ГФ РФ XIV подлинность ПРФ определяется в тесте латекс-

агглютинации, однако данные наборы не выпускаются в России, что может вызывать определенные трудности. Замена иммунохимического метода анализа, предлагаемого ГФ РФ, на физико-химический (протонная ЯМР-спектроскопия) является рентабельной и, возможно, единственной, тем более что тест на подлинность методом протонной ЯМР утвержден в Европейской фармакопее и рекомендован Всемирной организацией здравоохранения [18].

Заключение

В ходе выполнения работы нами были отработаны методы контроля технологической цепочки получения полисахарида ПРФ грамотрицательной бактерии *H. influenzae* типа b. Получаемый продукт характеризуется высокой степенью очистки и сохранностью антигенных детерминант и может быть использован для конъюгации с белком-носителем для получения полноценного вакцинного препарата против гемофильной инфекции у детей.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках научно-производственной программы предприятия «Гритвак».

Funding information

The work was carried out under scientific and production program of Gritvak LLC.

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. World Health Organization: Immunization, Vaccines and Biologicals. Haemophilus influenzae type b (Hib). Available at: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/sentinel/Hib/en/ (accessed: 29.01.2018)
2. Adderson EE, Byington CL, Spencer L, Kimball A, Hindiye M, Carroll K, et al. Invasive serotype a Haemophilus influenzae infections with a virulence genotype resembling Haemophilus influenzae type b: emerging pathogen in the vaccine era? Pediatrics. 2001 Jul;108(1):E18. DOI: 10.1542/peds.108.1.e18
3. Харченко ГА, Кимирилова ОГ. Гемофильная инфекция у детей при спорадической заболеваемости: клинические случаи с разным (благоприятным или летальным) исходом. Вопросы современной педиатрии. 2017;16(3):241-245. DOI: 10.15690/vsp.v16i3.1735
4. Gilsdorf JR. Hib Vaccines: Their Impact on Haemophilus influenzae Type b Disease. J Infect Dis. 2021 Sep 30;224(12 Suppl 2):S321-S330. DOI: 10.1093/infdis/jiaa537
5. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Приказ от 6 декабря 2021 г. №1122н об утверждении национального календаря профилактических прививок, календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям и порядка проведения профилактических прививок. Режим доступа: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202112200070>
6. Avci FY, Kasper DL. How bacterial carbohydrates influence the adaptive immune system. Annu Rev Immunol. 2010;28:107-30. DOI: 10.1146/annurev-immunol-030409-101159

7. Semmes EC, Chen JL, Goswami R, Burt TD, Permar SR, Fouda GG. Understanding Early-Life Adaptive Immunity to Guide Interventions for Pediatric Health. *Front Immunol.* 2021 Jan 21;11:595297. DOI: 10.3389/fimmu.2020.595297
8. Peset Llopis MJ, Harms G, Hardonk MJ, Timens W. Human immune response to pneumococcal polysaccharides: complement-mediated localization preferentially on CD21-positive splenic marginal zone B cells and follicular dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol.* 1996 Apr;97(4):1015-24. DOI: 10.1016/s0091-6749(96)80078-9
9. Pollard AJ, Bijker EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat Rev Immunol.* 2021 Feb;21(2):83-100. DOI: 10.1038/s41577-020-00479-7. Epub 2020 Dec 22. Erratum in: *Nat Rev Immunol.* 2021 Jan 5.
10. Sun X, Stefanetti G, Berti F, Kasper DL. Polysaccharide structure dictates mechanism of adaptive immune response to glycoconjugate vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019 Jan 2;116(1):193-198. DOI: 10.1073/pnas.1816401115
11. Елкина СИ, Сергеев ВВ, Ванеева НП, Апарин ПГ, Львов ВЛ, Ястребова НЕ, и др. Штамм *Haemophilus influenzae* В МЕЧ №1 – продуцент капсульного полисахарида – полирибозилрибитолфосфата. Пат. 2257412. Рос. Федерация №2004109822/13; заявл. 01.04.2004; опубл. 27.07.2005, Бюл. №21.
12. Kuo J-C. Isolation and purification of polyribozyl ribitol phosphate from *Haemophilus influenzae* type b. US4220717 (A) – 1980-09-02. Available at: https://www.espacenet.com/publicationDetails/biblio?FT=D&date=19800902&DB=EPODOC&locale=ru_RU&CC=US&NR=4220717A&KC=A&ND=5
13. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV издание. Режим доступа: <https://femb.ru/record/pharmacopea14?ysclid=Ihq9bpdizl521818070>
14. Lemercinier X, Jones C. An NMR spectroscopic identity test for the control of the capsular polysaccharide from *Haemophilus influenzae* type b. *Biologicals.* 2000 Sep;28(3):175-83. DOI: 10.1006/biol.2000.0255
15. Crisel RM, Baker RS, Dorman DE. Capsular polymer of *Haemophilus influenzae*, type b. I. Structural characterization of the capsular polymer of strain Eagan. *J Biol Chem.* 1975 Jul 10;250(13):4926-30. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)41257-X
16. Ashwell G. Colorimetric Analysis of Sugar. In: Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods in Enzymology.* Vol. 3. 1957; 73-105.
17. Kabat EA, Mayer M. Carbohydrate estimation. In: *Experimental immunochemistry.* Springfield, IL: C Thomas; 1961; 526e37.
18. Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. WHO Technical Report Series. №897, 2000. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/hib-conjugate-vaccines-annex-1-trs-no-897>
19. provedeniya profilakticheskikh privivok. Available at: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202112200070> (In Russian).
20. Avci FY, Kasper DL. How bacterial carbohydrates influence the adaptive immune system. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:107-30. DOI: 10.1146/annurev-immunol-030409-101159
21. Semmes EC, Chen JL, Goswami R, Burt TD, Permar SR, Fouda GG. Understanding Early-Life Adaptive Immunity to Guide Interventions for Pediatric Health. *Front Immunol.* 2021 Jan 21;11:595297. DOI: 10.3389/fimmu.2020.595297
22. Peset Llopis MJ, Harms G, Hardonk MJ, Timens W. Human immune response to pneumococcal polysaccharides: complement-mediated localization preferentially on CD21-positive splenic marginal zone B cells and follicular dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol.* 1996 Apr;97(4):1015-24. DOI: 10.1016/s0091-6749(96)80078-9
23. Pollard AJ, Bijker EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat Rev Immunol.* 2021 Feb;21(2):83-100. DOI: 10.1038/s41577-020-00479-7. Epub 2020 Dec 22. Erratum in: *Nat Rev Immunol.* 2021 Jan 5.
24. Sun X, Stefanetti G, Berti F, Kasper DL. Polysaccharide structure dictates mechanism of adaptive immune response to glycoconjugate vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Jan 2;116(1):193-198. DOI: 10.1073/pnas.1816401115
25. Elkina SI, Sergeev VV, Vaneeva NP, Aparin PG, L'vov VL, Yastrebova NE, i dr. Shtamm *Haemophilus influenzae* B МЕЧ №1 – produtsent kapsul'nogo polisakharida – poliribozilribitolfosfa-ta. Pat. 2257412. Ros. Federatsiya №2004109822/13; zayavl. 01.04.2004; opubl. 27.07.2005, Byul. N21. (In Russian).
26. Kuo J-C. Isolation and purification of polyribozyl ribitol phosphate from *Haemophilus influenzae* type b. US4220717 (A) – 1980-09-02. Available at: https://www.espacenet.com/publicationDetails/biblio?FT=D&date=19800902&DB=EPODOC&locale=ru_RU&CC=US&NR=4220717A&KC=A&ND=5
27. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiiskoi Federatsii, XIV izdanie. Available at: <https://femb.ru/record/pharmacopea14?ysclid=Ihq9bpdizl521818070> (In Russian).
28. Lemercinier X, Jones C. An NMR spectroscopic identity test for the control of the capsular polysaccharide from *Haemophilus influenzae* type b. *Biologicals.* 2000 Sep;28(3):175-83. DOI: 10.1006/biol.2000.0255
29. Crisel RM, Baker RS, Dorman DE. Capsular polymer of *Haemophilus influenzae*, type b. I. Structural characterization of the capsular polymer of strain Eagan. *J Biol Chem.* 1975 Jul 10;250(13):4926-30. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)41257-X
30. Ashwell G. Colorimetric Analysis of Sugar. In: Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods in Enzymology.* Vol. 3. 1957;73-105.
31. Kabat EA, Mayer M. Carbohydrate estimation. In: *Experimental immunochemistry.* Springfield, IL: C Thomas; 1961;526e37.
32. Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. WHO Technical Report Series. №897, 2000. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/hib-conjugate-vaccines-annex-1-trs-no-897>

References

1. World Health Organization: Immunization, Vaccines and Biologicals. *Haemophilus influenzae* type b (Hib). Available at: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/sentinel/Hib/en/ (accessed: 29.01.2018)
2. Adderson EE, Byington CL, Spencer L, Kimball A, Hindiyyeh M, Carroll K, et al. Invasive serotype a *Haemophilus influenzae* infections with a virulence genotype resembling *Haemophilus influenzae* type b: emerging pathogen in the vaccine era? *Pediatrics.* 2001 Jul;108(1):E18. DOI: 10.1542/peds.108.1.e18
3. Kharchenko GA, Kimirilova OG. *Haemophilus influenzae* infection in children during sporadic morbidity: clinical cases with different (favorable or fatal) outcomes. *Current Pediatrics.* 2017;16(3):241-245. DOI: 10.15690/vsp.v16i3.1735 (In Russian).
4. Gilsdorf JR. Hib Vaccines: Their Impact on *Haemophilus influenzae* Type b Disease. *J Infect Dis.* 2021 Sep 30;224(12 Suppl 2):S321-S330. DOI: 10.1093/infdis/jiaa537
5. Ministerstvo zdravookhraneniya Rossiiskoi Federatsii. Prikaz ot 6 dekabrya 2021 g. №1122n ob utverzhenii natsional'nogo kalendarya profilakticheskikh privivok, kalendarya profilakticheskikh privivok po epidemicheskim pokazaniyam i poryadka

Информация о соавторах:

Стряхнин Пётр Алексеевич, лаборант лаборатории полисахаридных вакцин ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России

Курбатова Ирина Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории препаративной биохимии антигенов ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России

Казakov Игорь Александрович, начальник производственного участка №1 ООО «Гритвак»

Разваляева Надежда Алексеевна, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной технологии иммунопрепаратов ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России

Анкудинов Игорь Вениаминович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории полисахаридных вакцин ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России

Ганчо Татьяна Венадьевна, младший научный сотрудник лаборатории полисахаридных вакцин ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России

Ледов Владимир Алексеевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории полисахаридных вакцин ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России

Апарин Пётр Геннадьевич, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией полисахаридных вакцин ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России

about co-authors:

Petr A. Stryakhnin, technician, laboratory of polysaccharide vaccines, SRC Institute of Immunology FMBA of Russia

Irina Yu. Kurbatova, PhD, senior scientist, laboratory of antigen preparative biochemistry, SRC Institute of Immunology FMBA of Russia

Igor A. Kazakov, Head of Production site No 1, Gritvak LLC

Nadezhda A. Razvalyayeva, junior Researcher Laboratory of Immunopreparation Experimental Technology, SRC Institute of Immunology FMBA of Russia

Igor V. Ankudinov, PhD, senior scientist, laboratory of polysaccharide vaccines, SRC Institute of Immunology FMBA of Russia

Tatiana V. Gancho, junior researcher, laboratory of polysaccharide vaccines, SRC Institute of Immunology FMBA of Russia

Vladimir A. Ledov, PhD, leading scientist, laboratory of polysaccharide vaccines, SRC Institute of Immunology FMBA of Russia

Petr G. Aparin, PhD, head of polysaccharide vaccines laboratory, SRC Institute of Immunology FMBA of Russia

НОВОСТИ НАУКИ

Характеристика гипервирулентных мультиантибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* у стационарных пациентов с тяжелым течением COVID-19

Тяжелое течение заболевания COVID-19 у стационарных пациентов обусловлено комплексом причин, в том числе развитием вирусно-бактериальных ко-инфекций. Эмпирическое назначение антибиотиков наряду со сниженным инфекционным контролем способствует эпидемическому распространению микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью. Наиболее часто выявляемыми бактериальными патогенами при нозокомиальных инфекциях являются бактерии *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующие карбапенемазу. Значительное распространение указанные штаммы получили в период пандемии новой коронавирусной инфекции.

Цель. Представить фенотипическую и генетическую характеристику штаммов *K. pneumoniae*, как доминирующего патогена у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии с тяжелым течением COVID-19.

Пациенты и методы. 38 человек, из них 6 – имеющие тяжелое течение COVID-19, находившихся в отделениях реанимации и интенсивной терапии инфекционных клинических больниц Санкт-Петербурга и Москвы с июля 2020 г. по декабрь 2020 г. Все пациенты подписывали добровольное согласие на проведение диагностических исследований, данные о больных анонимизированы. Биоматериал: мокрота, бронхоальвеолярная лаважная жидкость, мазок из носоглотки. Методы исследования: бактериологическая идентификация бактериальных штаммов, тестирование на чувствительность к противомикробным препаратам, полногеномное секвенирование штаммов *K. pneumoniae*.

Результаты. Геномы большинства штаммов *K. pneumoniae*, выделенные от больных с тяжелым течением новой коронавирусной инфекции, содержали кластеры генов аэробактерина и энтеробактерина. Однако некоторые, а именно геномы штаммов 90 и 124, кроме них, содержали кластеры генов иерсиниабактина. Эти гены являются маркерами высокой вирулентности и способности к образованию биопленок. Изученные штаммы отнесены к четырем типам последовательностей (ST874, ST395, ST147, ST15), которые характеризуются высокой вирулентностью и антибиотикорезистентностью. Наличие указанных штаммов *K. pneumoniae* можно рассматривать в качестве одного из ведущих причинных факторов развития тяжелых и летальных форм COVID-19.

Заключение. Данные нашего наблюдения демонстрируют рост показателя выявляемости патогена – *K. pneumoniae* – с 30 до 70% у пациентов с COVID-19 в течение пандемического периода. При этом более 80% штаммов были полирезистентны в фенотипических тестах к большинству антибиотиков, используемых в стратегиях терапии осложненного течения COVID-19. Сочетание гипервирулентности и антибиотикорезистентности имеет определяющее значение в распространении подобных штаммов в стационаре и их влиянии на исход заболевания. Появление гиперрезистентных патогенов подчеркивает необходимость проведения регулярного эпидемиологического мониторинга и строгих мер инфекционного контроля в стационарах России, особенно в отделениях реанимации и интенсивной терапии.

Гончаров А.Е., Азаров Д.В., Мохов А.С., Почтовый А.А., Кустова Д.Д., Гушин В.А., Лебедева Е.А., Колодziejewa В.В., Киреева А.Г., Краева Л.А., Долинный С.В., Бургасова О.А., Гончарова А.Р., Белькова Е.И., Дмитриев А.В.
Инфекционные болезни. 2022; 20(2): 33–40. DOI: 10.20953/1729-9225-2022-2-33-40

Источник: <https://www.phdynasty.ru>

Почвенные очаги и влияние компонентов биоты почвы на возбудителя сибирской язвы

Л.И.Маринин¹, Н.А.Шишкова¹, Е.А.Тюрин¹, А.Н.Мокриевич¹, И.А.Дятлов¹, А.Ф.Шуляк²

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

²ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.Р.Коваленко РАН», Москва, Российская Федерация

В работе проведен анализ возникновения вспышек сибирской язвы, связанных с почвенными очагами данного заболевания и сибиреязвенными скотомогильниками на территории Российской Федерации и мира. Проведен анализ влияния факторов почвы сибиреязвенного скотомогильника на жизнеспособность и изменчивость свойств возбудителя сибирской язвы. Почва сибиреязвенного скотомогильника является долговечным и постоянно действующим очагом инфекции и может служить вторым основным источником сибиреязвенной инфекции, так как считается вполне доказанной возможность непосредственного заражения животных и людей от почвы. В связи с этим проблема экологической опасности сибиреязвенных скотомогильников и отдельных захоронений актуальна и напрямую связана со способностью возбудителя образовывать спорую форму, обеспечивающую длительное сохранение не только жизнеспособности, но и вирулентности. Во время нахождения в почве сибиреязвенный микроб подвергается воздействию различных факторов. У него много антагонистов среди растений и микроорганизмов, он контактирует с другими микроорганизмами, амебами, червями. Длительное пребывание и вегетирование возбудителя сибирской язвы в почве при соответствующих условиях приводит к постепенным изменениям его свойств, что показано в наших исследованиях.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, сибирская язва, возбудитель, сохраняемость, биота, почва, скотомогильник

Для цитирования: Маринин Л.И., Шишкова Н.А., Тюрин Е.А., Мокриевич А.Н., Дятлов И.А., Шуляк А.Ф. Почвенные очаги и влияние компонентов биоты почвы на возбудителя сибирской язвы. Бактериология. 2023; 8(3): 83–91. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-83-91

Influence of soil biota components on the anthrax pathogen

L.I.Marinin¹, N.A.Shishkova¹, E.A.Tyurin¹, A.N.Mokrievich¹, I.A.Dyatlov¹, A.F.Shulyak²

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

²K.I.Skryabin and Ya.R.Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Sciences RAS, Moscow, Russian Federation

The paper analyzes the influence of soil factors of the anthrax cattle burial ground on the viability and variability of the properties of the anthrax pathogen. The soil of the anthrax cattle burial ground is a long-lasting and permanent focus of infection. Soil can serve as the second main source of anthrax infection, since it is considered to be a proven possibility of direct infection of animals and people from the soil. In this regard, the problem of the environmental hazard of anthrax cattle burial grounds and individual burials is relevant and is directly related to the ability of the pathogen to form a spore form, which ensures long-term preservation of not only viability, but also virulence. While in the soil, the anthrax microbe is exposed to various factors. It has many antagonists among plants and microorganisms, in contact with other microorganisms, amoebas, worms. Long-term stay and vegetation of the anthrax pathogen in the soil under appropriate conditions leads to gradual changes in its properties, which is shown in our studies.

Key words: *Bacillus anthracis*, anthrax, causative agent, preservation, soil, biota, cattle burial ground

For citation: Marinin L.I., Shishkova N.A., Tyurin E.A., Mokrievich A.N., Dyatlov I.A., Shulyak A.F. Influence of soil biota components on the anthrax pathogen. Bacteriology. 2023; 8(3): 83–91. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-83-91

Для корреспонденции:

Маринин Леонид Иванович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-00-03

Статья поступила 09.06.2023 принята к печати 29.09.2029

For correspondence:

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

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-00-03

The article was received 09.06.2023 accepted for publication 29.09.2029

Биота почвы – это сложное сообщество микроорганизмов и их фагов, растений, геобионтов, простейших, которые тесно взаимодействуют друг с другом [1]. Почву населяют разные виды микроорганизмов, в т.ч. опасные для человека. Нами проведено изучение микробного профиля почвы старого сибиреязвенного скотомогильника, существующего более 70 лет на берегу Иваньковского водохранилища в Конаковском районе Тверской области [2, 3]. Исследования показали, что большая часть микробной популяции представлена грамположительными спорообразующими палочками (около 60%), неспорообразующими палочками (около 20%), оставшаяся часть – стафилококки и кишечная палочка. Микробиологический анализ показал присутствие в почве скотомогильника сибиреязвенного микроба. Это свидетельствует о том, что сибиреязвенные скотомогильники или сибиреязвенные захоронения представляют угрозу экологической безопасности.

К скотомогильникам относятся места для долговременного захоронения трупов сельскохозяйственных животных, павших или забитых вследствие заболевания сибирской язвы. По определению Д.Н.Николаенко, скотомогильник является потенциальной эпигеосистемой [4]. Это территория, которая может быть причиной возникновения вспышки заболевания сибирской язвой. Причины такой вспышки могут быть различными – от прямого вмешательства человека до геоморфологических процессов.

В Российской Федерации (РФ) насчитывается около 35 тыс. стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов (СНП) с почвенными очагами, в которых учтено 7940 сибиреязвенных скотомогильников. По официальным данным ветеринарной службы, в 2011 г. число учтенных сибиреязвенных скотомогильников составило 14 026 [5]. Наименее опасны оформленные и зарегистрированные скотомогильники. Иначе обстоит дело со старыми или забытыми скотомогильниками, которые попадают в сферу хозяйственной деятельности человека или подвергаются природным ландшафтными изменениям: осыпанию склонов, подмыванию берегов рек, формированию оврагов и впадин.

Почва является основным резервуаром возбудителя сибирской язвы и основным фактором, поддерживающим непрерывность эпизоотического процесса в очагах инфекции [6]. По мнению отдельных авторов, почва может служить вторым основным источником сибиреязвенной инфекции, так как считается вполне доказанной возможность непосредственного заражения животных и людей от почвы [7–9].

Инфицирование споровой формой *Bacillus anthracis* отмечалось при заражении от контаминированной почвы в 3–14% от общего числа заболеваний. В Чувашской Автономной Республике с 1955 по 1961 г. из числа людей, заболевших сибирской язвой, каждый четвертый был инфицирован через почву, а после 1961 г. заражения людей произошли через почву в половине случаев [10].

Интересный случай заражения от почвы скотомогильника приводит Д.И.Дранкин [9]. Полуторамесячный ребенок заболел сибирской язвой. Лишь тщательное эпидемиологическое обследование помогло врачам установить механизм заражения. Оказалось, что несколько членов семьи собрали грибы на территории старого скотомогильника. Грибы, не освободив от комочков земли, свалили в детскую ванночку

из оцинкованного железа. Через день грибы обработали и съели, а еще через день в этой ванночке купали ребенка. Примерно через неделю на коже туловища ребенка развился сибиреязвенный карбункул. Диагноз был подтвержден обнаружением возбудителя при лабораторном исследовании частичек почвы, сохранившихся в пазах ванночки.

К сильному обсеменению почвы спорами возбудителя сибирской язвы приводили захоронения трупов животных в личных огородах. Употребление в пищу картофеля и овощей, выращенных на таких огородах, вызвало групповое заболевание 15 человек, из которых 14 умерли [11]. В другом случае при аналогичной ситуации заболели и умерли 9 человек.

Наряду со скотомогильниками значительную опасность представляют места забоя и гибели больных животных, особенно в агональном состоянии. Возбудитель попадает в почву с кровью, нафаршированной полноценными капсульными клетками. Наши исследования показали, что в 1 см³ крови содержится до 1•10⁹ инкапсулированных микробных клеток, которые быстро переходят в спорую форму. В таких местах возбудителя сибирской язвы выявляли даже после дезинфекционной обработки почвы [3].

Проблема экологической опасности сибиреязвенных скотомогильников и отдельных захоронений актуальна не только для нашей страны и стран СНГ, но и для большинства развитых и развивающихся стран мира и напрямую связана со способностью возбудителя образовывать спорую форму. Регистрируются новые очаги болезни в ранее благополучной местности или «ожившие» старые неблагополучные пункты при проведении земляных работ, в результате водной или ветровой эрозии, наводнений, землетрясений [12].

В некоторых местностях почва является долговечным и постоянно действующим очагом инфекции – «проклятые поля» Боса во Франции, долина реки Нене в Англии, скотомогильники в Южной Дакоте, бассейны Миссисипи и Миссури в США, Плевенская область в Болгарии и др. [13].

Если инфицированные пастбища называют «проклятыми полями», то бывшие скотопогонные трассы можно назвать «проклятыми дорогами», так как на этих участках постоянно возникали случаи заболевания животных сибирской язвой. Такие трассы описаны в работах из США и Австралии. Из США в 1980-х гг. приходили регулярные сообщения о случаях сибирской язвы из штатов, составляющих «старый Техасский коридор по перевозке крупного рогатого скота», куда входят Луизиана, Оклахома, Колорадо и Канзас [13]. В Австралии вспышка произошла в 1997 г. на территории административной дороги, по которой перегоняли скот в прошлом столетии и наблюдали большое количество заболевших животных в 1890 г. [14, 15].

В России также известны заболевания не только животных, но и людей на скотопогонной трассе Арзамас–Горький [16]. Заболевания сибирской язвой среди людей и животных в районах, прилегающих к трассе, регистрировались ежегодно начиная с 1953 г. Всего в течение августа 1960 г. на скотопогонной трассе и на мясоперерабатывающем заводе в г. Горьком погибло от сибирской язвы 56 голов крупного рогатого скота. За период с 9 по 26 августа зарегистрировано 9 случаев заболеваний людей кожной формой сибирской язвы.

Наблюдения показали, что несоблюдение санитарно-ветеринарных правил на скотопрогонных трассах, особенно в периоды массовых мясозаготовок, может повлечь за собой гибель скота и групповое заражение людей, а также причинить экономике значительный материальный ущерб.

На основании информации о всех известных за последние более чем 100 лет СНП в России создан «Кадастр стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации» [17]. В нем отражены сведения о локализации СНП – республика, область, район, сельская администрация, населенный пункт. Кадастр содержит также сведения о годах, когда регистрировались случаи заболевания сибирской язвой людей и животных.

Всего в РФ за период 1900–2003 гг. зарегистрирован 36 091 адрес СНП, в которых учтено более 72 000 вспышек и отдельных случаев заболеваний сибирской язвой людей и животных. По данным Кадастра в Московской области отмечено 276 СНП, Тверской – 484, Свердловской – 402, Республике Саха (Якутия) – 272, а в Нижегородской области – 1966 СНП. Включенные в Кадастр сведения отражают целостную характеристику почвенных очагов сибирской язвы, позволяют проводить ретроспективный анализ и дают возможность прогнозировать активизацию очагов. Однако встречаются и неучтенные скотомогильники. Так, на основании паспортизации скотомогильников в Республике Бурятия выявлено 231 сибиреязвенное захоронение, из них всего лишь для 9 установлено точное местонахождение [18]. В 2000 г. в Тамбовской области источником заражения животных послужил разрытый при проведении земляных работ неучтенный скотомогильник, хотя ранее местность считалась благополучной по сибирской язве. По классификации Всемирной организации здравоохранения территория России относится к зоне спорадического проявления инфекции [19].

По сведениям Управления ветеринарии с Государственной ветеринарной инспекцией Минсельхозпрода Московской области, на территории Московской области по результатам анализа данных за 1901–1988 гг. официально зарегистрировано 265 скотомогильников разных сроков захоронения сибиреязвенных трупов животных, в т.ч. и в г. Москве. Однако лишь по 42 из них указаны приблизительные координаты захоронения сибиреязвенных трупов животных, а по остальным 235 нет никаких данных о местах захоронений.

По данным Управления Россельхознадзора, в Московской области на начало 2013 г. имелось 119 учтенных скотомогильников, из них более 30% являлись бесхозными. Существуют и неучтенные скотомогильники. Весной 2012 г. представители Управления Россельхознадзора по г. Москве, Московской и Тульской областям и Главного управления ветеринарии Московской области обследовали 37 сибиреязвенных скотомогильников области (из 119 учтенных). На большей части проверенных скотомогильников выявлены нарушения ветеринарно-санитарных правил [20]: отсутствовали ограждения, нарушены правила содержания и др.

В Серпуховском районе Московской области зарегистрировано 12 скотомогильников. Проявления сибирской язвы в основном зарегистрированы в 1940–1950-х гг., но имели место и в 1960–1970-х гг. В некоторых местностях вспышки заболеваемости сибирской язвой отмечались по 2–3 раза.

На карте мы не нашли трех населенных пунктов. Осталось только уточнить конкретные места захоронений животных, погибших от сибирской язвы.

Опасность ситуации по сибирской язве на административных территориях устанавливают в соответствии с Методическими рекомендациями МР 3.1.0232-21, которые содержат алгоритм количественной оценки опасности почвенных очагов сибирской язвы на основе комплексного анализа эпизоотологической и эпидемиологической ситуации, характеристики почвенного очага, а также природных, социальных и биологических факторов риска [21].

Опасность сибирской язвы связана с длительной выживаемостью спорной формы возбудителя в окружающей среде. При этом устойчивость и длительность выживания возбудителя сибирской язвы зависят от многих факторов, к числу которых следует отнести форму клеток. Микроб в вегетативной форме характеризуется обычной резистентностью, свойственной другим бактериям. Споры отличаются исключительной устойчивостью.

Сибиреязвенная бактерия вне организма при доступе кислорода воздуха образует споры, которые чрезвычайно устойчивы к высокой температуре, высушиванию и дезинфицирующим веществам. В спорной форме возбудитель способен к длительному переживанию в почве, создавая стационарно-неблагополучные регионы. В 1887 г. Р.Кох писал: «...Споры выживают каким-то невероятным образом. Ни годы засухи, ни существование в течение месяцев в гниющей жидкости, ни чередование засухи и влаги не могут лишить их способности прорасти. Когда эти споры уже образовались, то появляются достаточные предпосылки для сохранения сибирской язвы в течение длительного времени в определенном районе» [22].

Контаминированная почва может оставаться инфекционной многие годы, даже десятилетия. Зарегистрирован случай сибирской язвы у человека, заразившегося на месте захоронения трупов сельскохозяйственных животных, проведенного более 80 лет тому назад [23]. Одним из примеров служит вспышка, произошедшая в Савоие (Франция). Во время строительства автомагистрали в ходе работ было затронуто место захоронения животных, просуществовавшее 44 года после закрытия скотомогильника. Вследствие этого произошла контаминация пастбищ, что привело к возникновению заболеваний у животных, которые, в свою очередь, стали причиной заболеваний людей [24].

Показательна вспышка сибирской язвы в Австралии, возникшая в местности, где заболевания не регистрировались 83 года [14].

В Ямало-Ненецком автономном округе вспышки сибирской язвы не регистрировались 75 лет [25].

Заслуживает внимания сообщение о выделении двух жизнеспособных штаммов возбудителя сибирской язвы из костей животных, найденных при археологических раскопках в Национальном парке Крюгера (Южная Африка). Радиоуглеродный анализ этих костей показал, что они принадлежат животным, погибшим от сибирской язвы 200 ± 50 лет назад [26].

Имеется предположение, что возбудитель сибирской язвы может быть активным через 1300 лет. Так, в Пермской области в пробах грунта, взятых на месте археологических

раскопок поселения VII века, был обнаружен возбудитель сибирской язвы, вызвавший заболевание животного [27].

Подтверждением длительной сохраняемости жизнеспособности возбудителем сибирской язвы является выделение нашими сотрудниками вирулентных штаммов сибиреязвенных культур из проб почвы, взятых на месте старого скотомогильника, существующего более 70 лет на берегу Ивановского водохранилища в Тверской области [2, 3]. Согласно имеющейся информации, в Тверской области в XIX веке было около 500 вспышек сибирской язвы, в XX веке – 484. Предположительно, на дне Ивановского водохранилища находятся 43 затопленных скотомогильника и еще 91 размещены в водоохранной зоне. Известно, что в связи со строительством водохранилища в 1936 г. на указанной территории наблюдалась крупная вспышка сибирской язвы [28]. Плотность захоронений животных, павших от сибирской язвы, составляет 5–6 скотомогильников на каждые 3 км берега Ивановского водохранилища.

Все сказанное свидетельствует о том, что возбудитель за время нахождения в почве длительно сохраняет не только жизнеспособность, но и вирулентность.

При определенных условиях возбудитель, независимо от степени вирулентности, может пройти цикл развития от споры через вегетацию к образованию нового поколения спор. Продолжительное развитие возбудителя в почве, особенно в неблагоприятных условиях, сопровождается изменением его свойств и появлением вариантов с разной вирулентностью. Изменения свойств можно объяснить протеканием жизненного цикла возбудителя в почве, который Г.В.Колонин [12] описывает следующим образом. Микроб попадает в организм восприимчивого животного, размножается в нем, убивает его и выходит во внешнюю среду, где бациллы спорулируют, фиксируя высокую степень вирулентности; т.е. спора позволяет микробу сохранить длительное время не только жизнеспособность, но и исходную вирулентность.

Однако вегетация в почве под воздействием абиотических и биотических факторов среды сопровождается гибелью значительной части микробной популяции, а уцелевшие микробы в процессе длительного размножения диссоциируют. Диссоциативные процессы, являющиеся проявлением адаптационной изменчивости, затрагивают антигенную структуру, вирулентность и ряд других существенных признаков микроорганизма. При этом адаптационная изменчивость патогенных бактерий при переходе от паразитического существования к сапрофитическому и наоборот имеет индивидуальный и популяционный характер. Индивидуальная изменчивость обусловлена генетическими и молекулярно-биологическими событиями в отдельной микробной клетке. Изменения признаков могут происходить с использованием имеющейся или приобретением новой генетической информации путем различных геномных перестроек или за счет внешних источников. Популяционная изменчивость возбудителя при смене среды обитания заключается в адаптивной перестройке всей внеорганизменной части популяции, в основе которой лежит ее гетерогенность. Селективные процессы в новой среде обитания смещают эту гетерогенность в адекватном направлении. В результате «самоперестройки» популяции в окружающей среде происходит постепен-

ное изменение состава популяции и формируются слабо- и авирулентные штаммы [29]. По мнению Н.Н.Гинсбурга [30], длительное пребывание и вегетирование возбудителя сибирской язвы в почве при соответствующих условиях приводит к постепенным изменениям его культурально-морфологических, антигенных и прочих характеристик, а также к постепенной потере им вирулентности.

Находясь в почве, возбудитель при благоприятных условиях может многократно проходить полный биологический цикл своего развития: спора → вегетативная клетка → спора или вегетативная клетка → вегетативная клетка → спора, в зависимости от того, в какой форме возбудитель попал в почву [31]. Накопление или гибель микробной популяции зависят от ряда природных факторов, и в первую очередь от наличия и состава питательных веществ. При внезапном падении температуры или прекращении доступа кислорода воздуха спорообразование не доходит до конца. Прорастание спор и размножение микробов возбудителя сибирской язвы наблюдали даже при температуре 8–12°C, однако интенсивность размножения была невысокой. Спорообразование начиналось позже (на 4–8-е сутки) и затягивалось до 16–20 суток [32]. При этом некоторые считают, что продолжительное развитие возбудителя в почве сопровождается изменением его свойств с потерей вирулентности. Для сохранения патогенности возбудитель должен периодически попадать в живой макроорганизм, чтобы восстановить частично утраченные свойства, т.е. чередовать генерации в почве с развитием в организме.

Во время нахождения в почве сибиреязвенный микроб подвергается воздействию различных факторов. Он имеет много антагонистов среди растений и микроорганизмов, контактирует с другими микроорганизмами, бактериофагами, амебами, червями.

В научной литературе уделяется большое внимание явлению микробного антагонизма. О том, что почва может быть источником микроорганизмов, антагонистичных к бактериям, вызывающим заболевания человека и животных, известно давно. Еще в 1877 г. Пастер и Жубер сообщили, что *B. subtilis in vitro* и *in vivo* оказывают угнетающее действие на рост вегетативных клеток возбудителя сибирской язвы [33]. Достаточно детально этот вопрос рассмотрен в 1940-х гг. Были не только констатированы существующие антагонистические взаимоотношения среди микробных обитателей почвы, но и даны первые представления о механизмах ингибирующего действия. Именно в то время с использованием различных видов почвенных актиномицетов были выделены антагонистически активные вещества – антибиотики. Таким образом, была сформулирована точка зрения, утверждающая, что различные виды почвенных микроорганизмов способны формировать субстанции, которые ингибируют рост других конкурентных бактерий грамположительной и грамотрицательной природы, включая возбудителей инфекционных заболеваний.

В настоящее время известно значительное число почвенных микроорганизмов – антагонистов *B. anthracis*. Наиболее изучено влияние актиномицетов [34, 35], которые были рекомендованы в качестве средств освобождения почвы скотомогильников от *B. anthracis*. Высокая бактериостатическая активность в отношении *B. anthracis* была выявлена у микро-

флоры почвы, сена и соломы. При этом ведущими микробами-антагонистами *B. anthracis*, выделенными из почвы и кормов, были спорообразующие бациллы *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. mycoides*. Было установлено, что до 80–90% всей микрофлоры почвы составляют именно эти три бактерии, а также термофильные бактерии и другие микроорганизмы [36].

Из множества антагонистических организмов, выделенных из почвы, два вида были изучены более детально: один принадлежал к бактериям *Pseudomonas aeruginosa*, другой – к *Actinomyces*. Было показано, что эти микроорганизмы ингибировали рост некоторых грамотрицательных бактерий и в большей степени – многих грамположительных бактерий. Субстанции, произведенные этими антагонистами, были термостабильными, они проходили через бактериальные фильтры и частично растворялись в эфире. Высокоактивные субстанции ингибировали рост *Escherichia coli*, *Brucella abortus* и многих других патогенных бактерий.

Таким образом, можно заключить, что почва является не только местом обитания микроорганизмов, антагонистичных друг другу, но и неким резервуаром продуктов, обладающих антимикробными свойствами (органические кислоты, перекиси, альдегиды, антибиотики, бактериоцины и т.д.), которые участвуют в контактном или дистанционном (диффузия) воздействии на конкурирующие виды бактерий.

В Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э.Баумана было установлено, что наибольшим потенциалом антагонистического воздействия в почве в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, таких как *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Listeria monocitogenes*, обладали культуры рода *Bacillus*: *B. subtilis* В4, *B. subtilis* В5, а также актиномицеты *Streptomyces roseus* Ac31/2 и микромицеты *Trichoderma viride* Tr2.

В почвенных условиях существует высокая вероятность прямого контакта микробных продуцентов бактериоциноподобной субстанции и возбудителя сибирской язвы. С целью оценки микробного антагонизма в ГНЦ ПМБ были проведены исследования по совместному выращиванию продуцентов бактериоцинов и *B. anthracis*. В качестве продуцентов бактериоцинов использовали два штамма: *Enterococcus faecium* 1073 и бациллярный штамм *B. polymixa* 37. Была подобрана жидкая питательная среда, в которой прорастали и развивались как вегетативные клетки этих штаммов, так и споры *B. anthracis* штамма СТИ-1. Использовали три варианта смесей:

вариант 1 – *E. faecium* + *B. anthracis* СТИ-1;

вариант 2 – *B. polymixa* + *B. anthracis* СТИ-1;

вариант 3 – *E. faecium* + *B. polymixa* + *B. anthracis* СТИ-1.

Проведенный эксперимент позволил получить результаты по оценке совместимости трех культур на протяжении 30-суточного сосуществования в одинаковых условиях в одной жидкой питательной среде (табл. 1).

Из представленных в табл. 1 результатов следует, что при совместном культивировании штамма *E. faecium* и *B. anthracis* СТИ-1 (вариант 1) практически не видно взаимовлияния, однако при исследовании взаимодействия двух штаммов бацилл *B. polymixa* и *B. anthracis* СТИ-1 (вариант 2) такое взаимовлияние имеет место. Так, количество клеток *B.*

anthracis СТИ-1 на 30-е сутки снизилось на 4,35 log по сравнению с исходным уровнем.

В варианте 3 этого эксперимента были использованы все три вида культур и было отмечено, что опять нет подавления роста *E. faecium*, нет достоверного снижения численности клеток штамма *B. polymixa*, но по-прежнему было существенно снижено число клеток *B. anthracis* СТИ-1 (4,34 log).

Высокий уровень инактивации клеток сибирезвездного микроба клетками и продуктами синтеза бацилл *B. polymixa*, выявленный в этих опытах, указывает на то, что явление антагонизма между различными видами бацилл реально существует и может быть использовано в практических целях.

Во время нахождения в почве возбудитель сибирской язвы подвергается воздействию бактериофагов, способных трансдуцировать генетический материал в клетки *B. anthracis* и близкородственных микроорганизмов. С использованием фагов CP-51 и Tg-13ant был осуществлен перенос плазмиды капсулообразования pX02 в штаммы *B. anthracis*, *B. cereus* и *B. thuringiensis*. Полученные трансдуктанты, приобретя плазмиду капсулообразования, в атмосфере CO₂ продуцировали капсулу, и колонии *B. cereus* и *B. thuringiensis* не отличались от колоний *B. anthracis* [3].

В почве в большом количестве находятся микроскопические грибы разных таксономических групп. Они продуцируют биологически активные вещества различной химической природы и специфики действия, в т.ч. антибиотики, ферменты и различные метаболиты. Грибы обладают антагонистическими свойствами в отношении многих групп организмов: бактерий, актиномицетов, дрожжей, вирусов.

В нашей лаборатории была изучена антибактериальная активность микромицетов в отношении возбудителя сибирской язвы [3]. Исследовали 505 грибных штаммов, относящихся к 225 видам 115 родов. Активными против *B. anthracis* оказались 105 штаммов, относящихся к 69 видам 33 родов. Из них 20 штаммов показали высокую активность, 80 штаммов оказались умеренно активными и 5 штаммов проявили слабую активность.

Длительное время дискутируется вопрос о влиянии дождевых червей на возбудителя сибирской язвы, находящегося в почве. Аристотель называл дождевых червей кишечником земли [3]. И это действительно так: пропуская через

Таблица 1. Сосуществование клеток штамма *B. anthracis* СТИ-1 с клетками штаммов-продуцентов бактериоцина
Table 1. Coexistence of cells of the *B. anthracis* STI-1 with cells of bacteriocin-producing strains

Время инкубирования, сутки / Incubation time, days	Концентрации клеток в культуральной жидкости во время инкубации по вариантам, log числа кл./см ³ среды / Cell concentrations in the culture fluid during incubation according to variants, log number of cells/cm ³ of medium						
	1-й вариант / variant 1		2-й вариант / variant 2		3-й вариант / variant 3		
	1073 + СТИ-1		В37 + СТИ-1		1073 + В37+ СТИ-1		
0	7,00	6,54	6,46	6,65	6,79	6,55	6,34
1	8,34	6,9	7,68	4,95	8,15	7,68	4,95
2	8,52	7,95	7,37	4,95	8,33	5,95	6,20
3	8,52	6,77	7,04	4,95	8,48	6,20	3,95
7	8,45	7,83	4,30	2,0	8,28	7,14	2,30
30	8,24	7,54	5,69	2,3	8,31	6,47	2,00

свой кишечник землю и растительные остатки, черви обогащают почву. Доказано, что черви питаются бактериями и грибами. Пищеварительный тракт червей представляет собой особое место обитания микроорганизмов в почве, в кишечнике червей ускоряется размножение почвенных бактерий и прорастают споры грибов. Черви способствуют расселению в почве микромицетов и сапрофитных бактерий, которые продуцируют антимикробные препараты.

Начиная с Л.Пастера считалось, что дождевые черви выносят возбудителя сибирской язвы из глубины почвы на ее поверхность [33]. Но оказалось, что роль червей значительно шире. В ответ на экстремальные условия среды обитания у дождевого червя сформировалась уникальная иммунная система, которая представлена антибиотической ферментативной системой, комплексом специфических иммунных клеток и комплементарных белков [37].

В нашей лаборатории было изучено влияние дождевых червей на очищение почвы от возбудителя сибирской язвы [3]. Для этого был отработан метод определения воздействия дождевых червей на сибиреязвенный микроб в почве. В работе использовали красных калифорнийских дождевых червей.

По отработанной методике провели оценку эффективности использования дождевых червей для элиминации из почвы споровых и вегетативных форм сибиреязвенного микроба.

На основании полученных данных можно сделать заключение о том, что в присутствии дождевых червей происходит снижение в почве количества сибиреязвенных бацилл (от 30 до 50%), но оставшиеся споры не изменили своих свойств и сохранили все основные биологические и генетические факторы патогенности.

Кроме дождевых червей, в почве находится значительное количество простейших-геобионтов, в т.ч. амёб, которые могут оказывать влияние на споры *B. anthracis*. Сотрудники нашей лаборатории изучили взаимодействие между возбудителем сибирской язвы и почвенными амёбами [3]. Были поставлены модельные эксперименты, в которых в качестве простейших-геобионтов использовали почвенную амёбу *Acanthamoeba castellanii* 50739, одно из наиболее распространенных простейших в почве.

Внесение спор в культуру *A. castellanii* и совместное их культивирование приводило к захвату спор амёбами и их прорастанию в цитоплазме. Последующий мониторинг амёбного монослоя с помощью световой микроскопии позволил проследить стадии процесса прорастания спор *B. anthracis* в клетках *A. castellanii*. Через 24 ч после инфицирования в амёбах наблюдалось значительное количество непроросших либо прорастающих спор и отдельные вегетативные клетки. Непроросшие споры погибали в фагосомах амёб, формируя большое количество прозрачных вакуолей.

В дальнейшем, через 48 ч культивирования, количество вегетативных клеток внутри амёб увеличивалось, они образовывали цепочки, состоящие из нескольких клеток. Следует отметить, что не были обнаружены значительные различия микроскопической картины амёб, зараженных спорами различных штаммов *B. anthracis*.

Сравнение жизнеспособности внутриклеточно расположенных спор исследуемых штаммов в течение всего перио-

Таблица 2. Высевы из лизатов клеток *A. castellanii* после заражения их спорами *B. anthracis*
Table 2. Seeding of *A. castellanii* cell lysates after infection with *B. anthracis* spores

Штамм / Strain	KOE/cm ³ / CFU/sm ³		
	0 ч / 0 h	Через 24 ч / After 24 h	Через 48 ч / After 48 h
<i>B. anthracis</i> 81/1	1,7•10 ⁷	9,1•10 ⁷	7,8•10 ⁸
<i>B. anthracis</i> 71/12	3,1•10 ⁷	8,4•10 ⁷	5,7•10 ⁸
<i>B. anthracis</i> СТИ-1	2,4•10 ⁷	7,4•10 ⁷	6,1•10 ⁸
<i>B. anthracis</i> СТИ-Rif	2,9•10 ⁷	9,2•10 ⁷	8,3•10 ⁸
<i>B. anthracis</i> Ames	1,9•10 ⁷	1,0•10 ⁸	9,4•10 ⁸

да их культивирования в монослое *A. castellanii* также показало отсутствие значительных отличий этого показателя между исследуемыми штаммами *B. anthracis* (табл. 2).

Таким образом, было показано, что споры *B. anthracis* способны выживать, прорасти и размножиться внутри клеток почвенной амёбы *A. castellanii*.

Последующие высевы амёбных лизатов не выявили фенотипических изменений *B. anthracis* – на плотных питательных средах бактериальные клетки образовывали типичные для сибиреязвенного микроба колонии без признаков диссоциации. В то же время, в отличие от исследований на мышинных макрофагах, эксперименты с *A. castellanii* показали, что способность спор *B. anthracis* к сохранению жизнеспособности внутри амёб не зависела от генотипа штамма.

Заключение

Возбудитель сибирской язвы в споровой форме длительное время сохраняет в почве не только жизнеспособность, но и вирулентность. За время нахождения в почве он подвергается воздействию различных факторов. Экологические исследования показали, что *B. anthracis* широко взаимодействует с некоторыми членами сообщества почвы скотомогильника, включая микроорганизмы, растения, дождевых червей и почвенных амёб. Понимание того, как возбудитель сибирской язвы взаимодействует с ними, будет способствовать нашему пониманию сохранения его в почве и, в целом, эпидемиологии и экологии микроорганизма.

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. Биота почвы. Geography-ru.academic.ru. Режим доступа: <https://www.treeland.ru/article/home/pochva/biota.htm>
2. Шишкова НА, Маринин ЛИ, Мокриевич АН, и др. Микробный профиль сибиреязвенного скотомогильника до и после санации. В сб.: Отечественная эпидемиология в XXI веке: приоритетные и новые технологии в диагностике и профилактике болезней человека. Труды Юбилейной Всероссийской науч-

- ной конф., посвящ. 75-летию кафедры общей и военной эпидемиологии Военно-медицинской академии им. С.М.Кирова и 90-летию со дня рождения академика В.Д.Белякова. Санкт-Петербург, 19–20 апреля 2012 г. СПб., 2012; 167-168.
3. Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Шишкова НА, Фирстова ВВ. Сибирская язва вчера и сегодня. М.: Издательство «Династия», 2021.
 4. Николаенко ДВ. Скотомогильник как объект и предмет естественнонаучного исследования. Случай Украины. Энвайронментальная эпидемиология. 2011;2:211-329.
 5. Состояние ветеринарных служб субъектов Российской Федерации в 2011 г.: Отчет Информационно-аналитического центра Россельхознадзора. Владимир, 2012; 75-77.
 6. Ипатенко НГ, Гушин ВН, Щенев АИ, и др. Почва – основной резервуар возбудителя сибирской язвы. Ветеринария. 1991;12:23-26.
 7. Артеменков МП. Эпизоотологическая и эпидемиологическая обстановка по сибирской язве и меры борьбы с ней в Семипалатинской области Казахстана. В сб.: Достижения и перспективы борьбы с сибирской язвой в СССР. Сб. тез. докл. X Пленарного засед. Межведомств. комиссии по борьбе с сибирской язвой. М., 1978; 31-32.
 8. Атакишиева АЧ, Байрамова ЭБ, Шаджанов АН, и др. Современное состояние эпидемиологии, клиники и диагностики сибирской язвы в Туркмении. Здравоохранение Туркмении. 1991;6:18-21.
 9. Дранкин ДИ. Зоонозы (Болезни, передающиеся людям от животных). М.: Знание, 1983.
 10. Андронников ВА. Опыт организации мероприятий по профилактике сибирской язвы в Чувашии. В сб.: Вопросы эффективности противосибиреязвенных мероприятий. Матер. Всесоюз. науч. симпозиума IX Пленарного заседания междуведомств. научно-методич. комиссии по борьбе с сибирской язвой. М., 1974; 18-20.
 11. Садовникова ОИ. Случай группового заболевания людей висцеральной формой сибирской язвы. В сб.: Достижения и перспективы борьбы с сибирской язвой в СССР: Тез. докл. X Пленарного засед. междуведомств. научно-методич. комиссии по борьбе с сибирской язвой (Баку, 28–29 сентября 1978 г.). М., 1978; 136-137.
 12. Колонин ГВ. Эволюция сибирской язвы. Сообщение 1. Особенности циркуляции возбудителя и происхождение болезни. Журнал микробиологии. 1970;11:98-102.
 13. Шляхов ЭН. Распространение сибирской язвы, эпидемиологические особенности и организация борьбы с ней в зарубежных странах. Журнал микробиологии. 1957;11:137-142.
 14. Turner AJ, Galvin LW, Miller GT, Rubira RJ. Anthrax explodes in an Australian summer. Abstract Book. 3rd Intern. Confer. On Anthrax, 7–10 September. England, Plymouth. 1998;3.
 15. Hugh-Jones ME. Global trends in the incidence of anthrax in Livestock. Proc. Intern. Workshop on Anthrax. Winchester, England, Apr. 11–13, 1989. Salisbury Med. Bull. Special Supplement. 1990;68:2-4.
 16. Тимофеев МК, Карелина ВИ, Колушев ИГ. Вспышка сибирской язвы на скотопрогонной трассе Арзамас–Горький. Журнал микробиологии. 1962;6:32-35.
 17. Кадастр стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации. Справочник. М.: Интерсен, 2005.
 18. Симонова ЕГ, Галкин ВВ, Локтионова МН, Ладный ВИ. Сибиреязвенные скотомогильники на территории РФ и их биологическая безопасность. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2010;4:23-26.
 19. Hugh-Jones ME. World Situation 1993/94. Proc. Intern. Workshop on Anthrax. Winchester, England, Sept. 19–21, 1995. Salisbury Med Bull Special Supplement. 1996;87:1-2.
 20. Ветеринарно-санитарные правила сбора, утилизации и уничтожения биологических отходов» №13-7-2/469, 1995.
 21. Определение эпидемиологической опасности почвенных очагов сибирской язвы. Методические рекомендации МР 3.1.0232-21 (Утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 1 марта 2021 г.). 2021.
 22. Яновская МИ. Роберт Кох. М., 1962.
 23. Адамович ВЛ, Белицкая ГА, Кукарекин НФ. К вопросу оздоровления почвенных очагов сибирской язвы в Брянской области. В сб.: Вопросы эффективности противосибиреязвенных мероприятий. Матер. Всесоюз. науч. симпозиума IX Пленарного заседания междуведомств. научно-методич. комиссии по борьбе с сибирской язвой. М., 1974; 170-171.
 24. Descotes IP, Joubert L. Reversions epidemiologiques actuelles de la fièvre charbonneuse et opportunités de la reactualisation de la réglementation spéciale. Rev Med Vet. 1978;129:8-9, 1209-1221.
 25. Опыт ликвидации вспышки сибирской язвы на Ямале в 2016 году. Под ред. Поповой АЮ, Куличенко АН. Ижевск: ООО «Принт-2», 2017.
 26. Van den Bosch C. The ecology of anthrax in the Kruger National Park, South Africa. Proc. Intern. Workshop on Anthrax. Winchester, England, Apr. 11–13, 1989. Salisbury Med Bull Special Supplement. 1990;68:19-23.
 27. Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Шишкова НА, Герасимов ВН. Сибиреязвенные скотомогильники: проблемы и решения. М.: «Династия», 2017.
 28. Кноп АГ. Влияние антропогенного преобразования природы на почвенные очаги сибирской язвы. В сб.: Современные проблемы зоонозных инфекций. Тез. докл. Всесоюзной межведомственной конф. Симферополь, 1981. М., 1981; 25-27.
 29. Коронный АВ. Развитие бацилл антракса в почве и процессы изменчивости их. Сб. науч. трудов Эстонской сельскохозяйственной академии. Тарту, 1958;4:99-105.
 30. Гинсбург НН. Живые вакцины (История, элементы теории, практика). М., 1969.
 31. Соркин ЮИ, Родзиковский АВ. Экология сибиреязвенного микроба в естественных биоценозах почв различных природных зон СССР. Экология возбудителей сапронозов. Сб. науч. трудов. АМН СССР, Пробл. комиссия «Природноочаговые болезни человека». НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи. М.: НИИ ЭМ. 1988; 65-79.
 32. Косяченко НС, Грехова НВ, Сеянинов ЮО. Изучение сохраняемости спор представителей рода *Bacillus* в воде и почве при различных значениях pH и температуры. Ветеринария. 2016;3:19-22.
 33. Пастер Л. Об этиологии сибирской язвы. Избр. труды. Изд. АН СССР. М., 1960;2:547-548.
 34. Иванова ДП, Соркин ЮИ. Выявление микробов-антагонистов *Bacillus anthracis* в некоторых почвах Сибири. В кн.: Проблемы природной очаговости чумы. Часть 3. Иркутск, 1980; 74-75.
 35. Калюжная ЛД, Брянская АМ, Коротич АС, Касавченко ВП. Изучение антагонистического действия актиномицетов на бациллы сибирской язвы. Антибиотики. 1975;7:617-623.
 36. Монсонов АВ. Микробиологический мониторинг почв захоронений животных и скотомогильников на модельной территории Забайкальского края. Автореф. дисс. ... канд. вет. наук. Барнаул, 2010.
 37. Стом ДИ, Балаян АЭ, Полехина СВ, Быбин ВА. Способ тестирования активности препаратов, полученных из дождевых червей. Патент на изобретение 2377561, 2008. ГОУ ВПО Иркутский государственный университет.

References

1. Biota pochvy. Geography-ru.academic.ru. Available at: <https://www.treeland.ru/article/home/pochva/biota.htm> (In Russian).
2. Shishkova NA, Marinin LI, Mokrievich AN, et al. Mikrobnyi profil' sibiriazvennogo skotomogil'nika do i posle sanatsii. V sb.: Otechestvennaya epidemiologiya v XXI veke: prioritetye i novye tekhnologii v diagnostike i profilaktike boleznei

- cheloveka. Trudy Yubileinoi Vserossiiskoi nauchnoi konf., posvyashch. 75-letiyu kafedry obshchei i voennoi epidemiologii Voенно-meditsinskoi akademii im. S.M.Kirova i 90-letiyu so dnya rozhdeniya akademika V.D.Belyakova. Sankt-Peterburg, 19–20 aprelya 2012 g. Saint-Petersburg, 2012;167-168. (In Russian).
3. Marinin LI, Dyatlov IA, Shishkova NA, Firstova VV. Sibirskaya yazva vchera i segodnya. M.: Dinastiya Publ., 2021. (In Russian).
 4. Nikolaenko DV. Skotomogil'nik kak ob'ekt i predmet estestvennonauchnogo issledovaniya. Sluchai Ukrainy. Environmental'naya epidemiologiya. 2011;2:211-329. (In Russian).
 5. Sostoyanie veterinarnykh sluzhb sub'ektov Rossiiskoi Federatsii v 2011 g.: Otchet Informatsionno-analiticheskogo tsentra Rossel'khozadzora. Vladimir, 2012;75-77. (In Russian).
 6. Ipatenko NG, Gushchin VN, Shchenev AI, et al. Pochva – osnovnoi rezervuar vzbuditelya sibirskoi yazvy. Veterinariya. 1991;12:23-26. (In Russian).
 7. Artemenkov MP. Epizootologicheskaya i epidemiologicheskaya obstanovka po sibirskoi yazve i mery bor'by s nei v Semipalatinskoi oblasti Kazakhstana. V sb.: Dostizheniya i perspektivy bor'by s sibirskoi yazvoi v SSSR. Sb. tez. dokl. X Plenarnogo zased. Mezhdvedomstv. komissii po bor'be s sibirskoi yazvoi. M., 1978; 31-32. (In Russian).
 8. Atakishieva ACh, Bairamova EB, Shadzhonov AN, et al. Sovremennoe sostoyanie epidemiologii, kliniki i diagnostiki sibirskoi yazvy v Turkmenii. Zdravookhraneniye Turkmenii. 1991;6:18-21. (In Russian).
 9. Drankin DI. Zoonozy (Bolezni, peredayushchiesya lyudyam ot zhivotnykh). M.: Znanie Publ., 1983. (In Russian).
 10. Andronnikov VA. Opyt organizatsii meropriyatii po profilaktike sibirskoi yazvy v Chuvashii. V sb.: Voprosy effektivnosti protivosibireyazvennykh meropriyatii. Mater. Vsesoyuz. nauch. simpoziuma IX Plenarnogo zasedaniya mezhdvedomstv. nauchno-metodich. komissii po bor'be s sibirskoi yazvoi. Moscow, 1974;18-20. (In Russian).
 11. Sadovnikova OI. Sluchai gruppovogo zabolevaniya lyudei vistseral'noi formoi sibirskoi yazvy. V sb.: Dostizheniya i perspektivy bor'by s sibirskoi yazvoi v SSSR: Tez. dokl. X Plenarnogo zased. mezhdvedomstv. nauchno-metodich. komissii po bor'be s sibirskoi yazvoi (Baku, 28–29 sentyabrya 1978 g.). M., 1978; 136-137. (In Russian).
 12. Kolonin GV. Evolution of anthrax. I. Characteristics of circulation of the causative agent and origin of the disease. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 1970 Nov;47(11):98-102. (In Russian).
 13. Shlyakhov EN. Rasprostraneniye sibirskoi yazvy, epidemiologicheskie osobennosti i organizatsiya bor'by s nei v zarubezhnykh stranakh. Zhurn. mikrobiol. 1957;11:137-142. (In Russian).
 14. Turner AJ, Galvin LW, Miller GT, Rubira RJ. Anthrax explodes in an Australian summer. Abstract Book. 3rd Intern. Confer. On Anthrax, 7–10 September. England, Plymouth. 1998; 3.
 15. Hugh-Jones ME. Global trends in the incidence of anthrax in Livestock. Proc. Intern. Workshop on Anthrax. Winchester, England, Apr. 11–13, 1989. Salisbury Med. Bull. Special Supplement. 1990;68:2-4.
 16. Timofeev MK, Karelina VI, Kolushev IG. Vspysk sibirskoi yazvy na skotoprogonnoi trasse Arzamas–Gor'kii. Zhurnal mikrobiol. 1962;6:32-35. (In Russian).
 17. Kadastr statsionarno neblagopoluchnykh po sibirskoi yazve punktov Rossiiskoi Federatsii. Spravochnik. M.: Intersen, 2005. (In Russian).
 18. Simonova EG, Galkin VV, Loktionova MN, Ladnyi VI. Anthrax cattle burial grounds in Russia and their biosafety. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2010;4:23-26. (In Russian).
 19. Hugh-Jones ME. World Situation 1993/94. Proc. Intern. Workshop on Anthrax. Winchester, England, Sept. 19–21, 1995. Salisbury Med Bull Special Supplement. 1996;87:1-2.
 20. Veterinarno-sanitarnye pravila sbora, utilizatsii i nichtozheniya biologicheskikh otkhodov №13-7-2/469, 1995. (In Russian).
 21. Opredeleniye epidemiologicheskoi opasnosti pochvennykh ochagov sibirskoi yazvy. Metodicheskie rekomendatsii MR 3.1.0232-21 (Utv. Federal'noi sluzhboi po nadzoru v sfere zashchity prav potrebiteliy m blagopoluchiya cheloveka 1 marta 2021 g.). 2021. (In Russian).
 22. Yanovskaya MI. Robert Kokh. M., 1962. (In Russian).
 23. Adamovich VL, Belitskaya GA, Kukarekin NF. K voprosu ozdorovleniya pochvennykh ochagov sibirskoi yazvy v Bryanskoi oblasti. V sb.: Voprosy effektivnosti protivosibireyazvennykh meropriyatii. Mater. Vsesoyuz. nauch. simpoziuma IX Plenarnogo zasedaniya mezhdvedomstv. nauchno-metodich. komissii po bor'be s sibirskoi yazvoi. M., 1974; 170-171. (In Russian).
 24. Descotes IP, Joubert L. Reversions epidemiologiques actuelles de la fievre charbonneuse et opportunité de la reactualisation de la réglementation speciale. Rev Med Vet. 1978;129:8-9, 1209-1221.
 25. Opyt likvidatsii vspyski sibirskoi yazvy na Yamale v 2016 godu. Pod red. Popovoi AYu, Kulichenko AN. Izhevsk: OOO "Print-2", 2017. (In Russian).
 26. Van den Bosch C. The ecology of anthrax in the Kruger National Park, South Africa. Proc. Intern. Workshop on Anthrax. Winchester, England, Apr. 11–13, 1989. Salisbury Med Bull Special Supplement. 1990;68:19-23.
 27. Marinin LI, Dyatlov IA, Shishkova NA, Gerasimov VN. Sibireyazvennye skotomogil'niki: problemy i resheniya. M.: Dinastiya Publ., 2017. (In Russian).
 28. Knop AG. Vliyeniye antropogennogo preobrazovaniya prirody na pochvennye ochagi sibirskoi yazvy. V sb.: Sovremennye problemy zoonoznykh infektsii. Tez. dokl. Vsesoyuznoi mezhdvedomstvennoi konfer. Simferopol', 1981. M., 1981; 25-27. (In Russian).
 29. Koronnyi AV. Razvitiye batsill antraksa v pochve i protsessy izmenchivosti ikh. Sb. nauch. trudov Estonskoi sel'skokhozyaistvennoi akademii. Tartu, 1958;4:99-105. (In Russian).
 30. Ginsburg NN. Zhivye vaksiny (Istoriya, elementy teorii, praktika). M., 1969. (In Russian).
 31. Sorkin Yul, Rodzikovsky AV. Ekologiya sibireyazvennogo mikroba v estestvennykh biotsenozakh pochv razlichnykh prirodnykh zon SSSR. Ekologiya vzbuditeli sapronozov. Sb. nauch. trudov. AMN SSSR, Probl. komissiya "Prirodnoochagovye bolezni cheloveka". NII epidemiologii i mikrobiologii im. N.F.Gamalei. M.: NII EM. 1988; 65-79. (In Russian).
 32. Kosyachenko NS, Grekhova NV, Selyaninov YuO. The study of preservation capacity for some representatives of genus Bacillus in water and/or soil at various pH and temperature levels. Veterinariya. 2016;3:19-22. (In Russian).
 33. Paster L. Ob etiologii sibirskoi yazvy. Izbr. trudy. M., Izd. AN SSSR, 1960;2:547-548. (In Russian).
 34. Ivanova DP, Sorkin Yul. Vyyavleniye mikrobov-antagonistov Bacillus anthracis v nekotorykh pochvakh Sibiri. V kn.: Problemy prirodnoi ochagovosti chumy. Chast' 3. Irkutsk, 1980; 74-75. (In Russian).
 35. Kalyuzhnaya LD, Bryanskaya AM, Korotich AS, Kasavchenko VP. Izuchenie antagonisticheskogo deistviya aktinomitssetov na batsilly sibirskoi yazvy. Antibiotics. 1975;7:617-623. (In Russian).
 36. Monsonov AV. Mikrobiologicheskii monitoring pochv zakhronenii zhivotnykh i skotomogil'nikov na model'noi territorii Zabaikal'skogo kraya. Avtoref. diss. ... kand. vet. nauk. Barnaul, 2010. (In Russian).
 37. Stom DI, Balayan AE, Polekhina SV, Bybin VA. Sposob testirovaniya aktivnosti preparatov, poluchennykh iz dozhdnykh chervei. Patent na izobreteniye 2377561, 2008. GOU VPO Irkutskii gosudarstvennyi universitet. (In Russian).

Информация о соавторах:

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

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

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

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

Шуляк Анна Фёдоровна, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусологии ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.Р.Коваленко РАН»

Information about co-authors:

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

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

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

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

Anna F. Shulyak, PhD in Veterinary Sciences, Leading Researcher of the Laboratory of Virology K.I.Skryabin and Ya.R.Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Sciences RAS

Обнаружение генов устойчивости к антибиотикам в клинических образцах с помощью биоинформатических подходов

Известно, что различные устойчивые к антибиотикам бактерии вызывают повторные легочные инфекции и повышают заболеваемость и смертность. Тщательное знание спектра бактерий с генами устойчивости к антибиотикам (ARG) может повысить эффективность лечения антибиотиками.

По сравнению с использованием традиционных методов обнаружения, уровень ложноположительного обнаружения бактерий с генами антибиотикорезистентности (ARB) был значительно выше при использовании методов выравнивания и сборки метагеномного секвенирования следующего поколения (mNGS). Метод сборки может помочь определить возбудители, обнаруженные методом выравнивания, как истинные ARB и улучшить прогностические возможности (46% > 13%). Сеть ARG-ARB выявила основные ARG при преобладании ARB. Всего было обнаружено 361 ARG, которые в основном относились к классу мультилекарственных препаратов и классам β-лактамов антибиотиков. В частности, 101 ARG (существующие в двух подходах) и 34 ARG (обнаруженные только методом сборки) достигли четкой атрибуции ARG-бактерий и потенциально могли бы оптимизировать справочную базу данных по устойчивости к антибиотикам. Наиболее распространенными ARB и соответствующими ARG и классами препаратов в этом исследовании были следующие: *Acinetobacter baumannii* (ADE, мультипрепарат), *Pseudomonas aeruginosa* (MEX, мультипрепарат), *Klebsiella pneumoniae* (MDT, аминкумарин; EMR, фторхинолон), *Stenotrophomonas maltophilia* (SME), мультипрепарат) и *Corynebacterium striatum* (carA, MLSB).

В совокупности эти результаты продемонстрировали применимость выравнивания и сборки mNGS в качестве методов диагностики устойчивости к антибиотикам и выявили ARB и ARG, связанные с легочной инфекцией, потенциально в качестве мишеней для лечения антибиотиками легочной инфекции.



Dong T, Wang Y, Qi C, et al.

Sequencing methods to study the microbiome with antibiotic resistance genes in patients with pulmonary infections. 2023. Available at: <https://www.researchsquare.com/article/rs-3142484/v1> DOI: 10.21203/rs.3.rs-3142484/v1

Освоение промышленного производства набора менингококковых диагностических сывороток

Т.Ю.Гашенко^{1,2}, С.Г.Марданлы^{1,2}, Э.А.Мамедова¹

¹Закрытое акционерное общество «ЭКОлаб», Электрогорск, Российская Федерация;

²ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет», Орехово-Зуево, Российская Федерация

В статье охарактеризована медико-социальная значимость менингококковой инфекции и обоснована необходимость обеспечения отечественного здравоохранения наборами диагностических сывороток, необходимых для идентификации серогрупп менингококков, выделяемых от пациентов. Описаны основные стадии и операции производства набора «Сыворотки диагностические менингококковые для реакции агглютинации», разработанного специалистами ЗАО «ЭКОлаб».

Ключевые слова: менингококковая инфекция, этиологическая диагностика, сыворотки диагностические, промышленное производство

Для цитирования: Гашенко Т.Ю., Марданлы С.Г., Мамедова Э.А. Освоение промышленного производства набора менингококковых диагностических сывороток. Бактериология. 2023; 8(3): 92–97. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-92-97

Mastering the industrial production of a set of meningococcal diagnostic serums

T.Yu.Gashenko^{1,2}, S.H.Mardanly^{1,2}, E.A.Mamedova¹

¹Closed Joint Stock Company «ECOLab», Elektrogorsk, Russian Federation;

²State University of Humanities and Technology, Orekhovo-Zuyevo, Russian Federation

The article characterizes the medical and social significance of meningococcal infection and substantiates the need to provide domestic healthcare with sets of diagnostic serums that are necessary for the identification of serogroups of meningococci isolated from patients. The main stages and operations of the production of the set «Diagnostic meningococcal serums for agglutination reaction» developed by specialists of CJSC ECOLab are described

Key words: meningococcal infection, etiological diagnosis, diagnostic serums, industrial production

For citation: Gashenko T.Yu., Mardanly S.H., Mamedova E.A. Mastering the industrial production of a set of meningococcal diagnostic serums. Bacteriology. 2023; 8(3): 92–97. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-92-97

Одной из самых опасных по своим масштабам среди детей, неожиданной по возникновению и непредсказуемой по течению является менингококковая инфекция (МИ), которая предъявляет особые требования к организации диагностики и лечения уже с первых часов заболевания и занимает третье место по показателю смертности (после туберкулеза и ВИЧ-инфекции) [1–4].

МИ и в настоящее время остается актуальной проблемой здравоохранения, поскольку с высокой летальностью поражает преимущественно детей, а также дает значительный процент инвалидизации после перенесенного заболевания [5–7].

Для корреспонденции:

Гашенко Татьяна Юрьевна, кандидат биологических наук, генеральный директор ЗАО «ЭКОлаб»

Адрес: 142530, Московская обл., Электрогорск, ул. Буденного, 1
Телефон: (800) 333-33-47

Статья поступила 30.06.2023, принята к печати 29.09.2023

Возбудитель МИ – менингококк *Neisseria meningitidis*, относящийся к роду *Neisseria*, включающему также патогенный для человека вид *Neisseria gonorrhoeae* и входящему в семейство *Neisseriaceae*. Это грамотрицательный диплококк диаметром 0,6–1 мкм, имеющий форму кофейного зерна и выявляемый *in vitro* внутри- и внеклеточно. Вырабатывает эндо- и экзотоксин, очень неустойчив во внешней среде и требователен к питательным средам. Оптимальная температура роста – 37°C [1–4, 8].

Возбудитель выделен в 1887 г. Он серологически неоднороден – известно несколько серогрупп менингококка (А, В, С, Д, N, X, Y, Z, 29-E, W-135, K, H, L, I), причем иммунитет

For correspondence:

Tatyana Yu. Gashenko, PhD in Biological Sciences, General Director Closed Joint Stock Company «ECOLab»

Address: 1 Budyonny str., Elektrogorsk, Moscow region, 142530, Russian Federation
Phone: (800) 333-33-47

The article was received 30.06.2023, accepted for publication 29.09.2023

типоспецифичен, т.е. невосприимчивость к одной группе не защищает от заражения менингококками другой группы. Наиболее изученными считаются менингококки серогрупп А, В, С, Д, Х, W-135 [1–3], однако в оценке их значения нет единого мнения. Так, если серогруппу А практически все авторы рассматривают как «эпидемическую», то серогруппы В и С одними авторами рассматриваются также как «эпидемические» [1, 4], а другие полагают, что эти группы чаще всего отвечают за спорадические случаи [3].

МИ – типичный антропоноз. Источник инфекции – больной человек или бактерионоситель с бессимптомной формой инфекции; пути передачи – воздушно-капельный и контактно-бытовой; входные ворота инфекции – слизистая верхних дыхательных путей. Инкубационный период колеблется от 1 до 10 дней (чаще 2–4 дня). Наиболее заразны больные в острый период до начала лечения [1, 2].

Отмечаются периодические подъемы числа манифестных форм МИ, причем разные авторы указывают довольно различные интервалы между периодами (от 5 до 30 лет) [1–4, 9]. Отмечается также определенная сезонность МИ с нечетко выраженным пиком в зимне-весенний период, как правило, совпадающим с эпидемическим подъемом острых респираторных вирусных инфекций [1, 2].

Манифестные формы МИ, которые в подавляющем большинстве случаев вызываются менингококками серогрупп А, В, С, Y и W-135, наблюдаются преимущественно у детей до 15 лет (70–80%) и у лиц юношеского возраста (10–15%). Наиболее подверженный заболеванию возраст – дети первых трех лет жизни [1, 4, 8, 10].

Бессимптомные формы МИ характерны преимущественно для взрослого населения, обычно на 1 больного приходится 2–3 тыс. носителей, а во время эпидемий носительство может достигать 70–100% [1, 2].

Мировая эпидобстановка по МИ определяется в первую очередь эпидемиями в Африканском «менингитном поясе», который известен уже более 100 лет и тянется от Верхней Вольты до Судана на 4200 км и в среднем имеет ширину 600 км. Именно в странах «менингитного пояса» впервые были отмечены периодически возникающие эпидемические циклы. В настоящее время МИ зарегистрирована более чем в 150 странах мира [3, 4, 8–10].

В России в основном наблюдают МИ, вызванную серогруппами А, В и С, при этом доли серогрупп различаются несущественно [2, 3, 10]. В 1999–2014 гг. эпидобстановка оценивалась в целом как благополучная, хотя показатели заболеваемости по отдельным регионам превышали средние значения почти в 4 раза [2, 7, 10]. На межрегиональном совещании экспертов по проблеме «Менингококковая инфекция и вакцинопрофилактика», которое состоялось 11 февраля 2016 г. в Москве в рамках XIX Конгресса педиатров России с международным участием, отмечено, что в настоящее время в нашей стране зарегистрирован длительный межэпидемический период (24 года), однако высокий уровень циркуляции менингококков серогруппы А (30%), наличие неблагополучных по менингококковой инфекции территорий, рост заболеваемости менингококковой инфекцией, вызванной редкими серогруппами (W, Y, X), высокая доля (30%) выявленных впервые генетических клонов менингококка, способных оказывать негативное влияние на эпидемический процесс, ука-

зывают на вероятность очередного эпидемического подъема заболеваемости менингококковой инфекцией на территории России в ближайшее время [11].

Диагноз МИ требует обязательного лабораторного подтверждения, т.е. основным критерием окончательного диагноза является идентификация возбудителя посредством выделения его чистой культуры и определения его характеристик, включая определение группоспецифических свойств в реакции агглютинации на стекле с набором агглютинирующих антисывороток серогрупп А, В, С, Х, Y, Z, W-135, 29E [1, 10].

Все это обосновывает актуальность обеспечения своевременной и эффективной этиологической диагностики МИ, основой которой следует считать лабораторную клиническую диагностику. Она включает бактериологический, бактериоскопический и серологический методы исследования. Бактериологическому исследованию подвергаются носоглоточная слизь, кровь, спинномозговая жидкость [1, 2]. Идентификация серогруппы возбудителя, кроме этиологической диагностики, важна также для эпидемиологического анализа [3, 10]. Для этого чаще всего используется реакция агглютинации (РА) чистой культуры возбудителя, выделенной из организма пациента, с соответствующими диагностическими сыворотками [1], но может быть использована и реакция преципитации [12].

МИ по-прежнему остается неразрешимой проблемой здравоохранения, поскольку смертность и инвалидизация от болезни не снижаются [9]. Следует отметить, что, несмотря на совершенствование методов диагностики и увеличение до 67% (на 2018 г.) лабораторного подтверждения генерализованной формы менингококковой инфекции, третья часть случаев МИ остается не расшифрованной [7].

Очевидная медико-социальная значимость МИ и в особенности ее манифестных форм делает исключительно актуальной задачу обеспечения отечественной медицины средствами этиологической лабораторной диагностики, к числу которых вполне можно отнести и наборы диагностических менингококковых сывороток, позволяющие проводить идентификацию серотипов возбудителя с помощью РА на стекле, т.е. с использованием средств, доступных любой клинической лаборатории.

Анализ отечественного рынка показал, что его потребности в указанных наборах еще далеко не удовлетворены и, соответственно, освоение их производства и включение их в номенклатуру продукции ЗАО «ЭКОлаб» вполне оправдано.

Эти обстоятельства послужили основанием для разработки специалистами ЗАО «ЭКОлаб» набора «Сыворотки диагностические менингококковые для реакции агглютинации» и освоения технологии его промышленного производства. Разработка была выполнена с использованием опыта, накопленного предприятием при производстве наборов для лабораторной диагностики иммунохимическими методами [13], в т.ч. аналогичных вновь разработанному [14–17].

Набор предназначен для качественного выявления и подтверждения в культуре, выделенной при бактериологических исследованиях из биологического материала человека, *N. meningitidis* серогрупп А, В, С, Х, Y, Z, W-135, 29-E. В отличие от традиционного выпуска таких препаратов в стеклянных запаянных ампулах сыворотки упакованы во фла-

коны, закрытые резиновыми пробками и пластмассовыми завинчиваемыми крышками.

Предусмотрено 9 вариантов комплектации, отличающихся составом входящих в них сывороток (см. таблицу): в первом сыворотки содержат антитела ко всем указанным серогруппам возбудителя, все остальные варианты – это сыворотки с антителами только к одному из перечисленных типов. Каждый вариант, в свою очередь, представлен сухими (подварианты /1 и /2) и жидкими (подварианты /3 и /4) сыворотками, разлитыми по 1,0 мл (подварианты /1 и /3) или по 2,0 мл (подварианты /2 и /4). Кроме того, все подварианты варианта 1 комплектуются восемью флаконами, а подварианты вариантов 2–9 – либо одним, либо пятью флаконами. Все это дает 260 различных комплектов, что существенно облегчает потребителям выбор необходимых им вариантов комплектации.

Перечень серогрупп менингококков, которые предполагалось идентифицировать с использованием нового набора, определен МУК 4.2.1887-04 [10]. Необходимые для производства музейные штаммы менингококков были получены из ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России.

Технологическая схема, помимо стандартных для любого биотехнологического производства вспомогательных стадий и операций (все подготовительные и заключительные стадии и операции), включает также стандартные для получения такого рода продукции основные стадии – работу с музейными штаммами менингококков соответствующих серогрупп, получение рабочих посевных культур, наработку бактериальной массы и получение из нее препаратов для иммунизации животных-продуцентов, подготовку животных-продуцентов, их иммунизацию, отбор у иммунных продуцентов крови, получение и переработку сыворотки крови вплоть до фасовки, маркировки и упаковки готового продукта.

Работа с музейными штаммами, как обычно, сводится к периодическому обновлению их культур, находящихся на хранении в музее предприятия в замороженном (при -70...-80°C) состоянии.

Принципиальной особенностью этого процесса при работе со штаммами менингококков является необходимость селекции субкультур, полученных из музейных культур производственных штаммов, на полноценность содержания группоспецифических антигенов. Эта селекция выполняется посредством высева на чашки Петри с агаром Хоттингера взвеси менингококков из агаровых субкультур музейных штаммов, выдержанных 1–2 ч при 37°C в реакционной смеси, которая содержит взвесь лейкоцитов в плазме крови человека. Засеянные чашки Петри инкубируют 18–20 ч при 37°C, на агаре при этом вырастают колонии менингококков, избежавших фагоцитоза, за счет более полноценного содержания группоспецифических антигенов.

Селекционированные культуры визуально оценивают по типичности полученных колоний, по морфологии и тинкториальным свойствам клеток при микроскопии окрашенных по Граму мазков и исследуют в РА с гомологичными и гетерологичными сыворотками (РА на стекле и развернутая РА в пробирках). При этом РА на стекле должна быть отрицательной с гетерологичными сыворотками и положительной (на ++++) с гомологичными сыворотками, а развернутая РА с гомологичными сыворотками должна быть положительной в разведении не менее чем 1:40, кроме серогрупп В и 29Е, для которых максимальное разведение должно быть не менее 1:10.

Культуры, соответствующие по своим свойствам всем требованиям, предъявляемым к производственным штаммам менингококков, используют для обновления их музея, а также на следующих стадиях производства диагностических сывороток.

Эти стадии могут быть разделены на три группы: первая объединяет все процессы получения и переработки микробной биомассы, вторая – содержание животных-продуцентов крови, в качестве которых используются кролики породы шиншилла, их содержание, иммунизацию, забор крови у иммунизированных животных, третья – переработка полученной крови в конечный продукт производства (фасованные, упакованные и маркированные сыворотки менингококковые диагностические).

Для получения сывороток с наиболее широким спектром специфических антител в препарат для иммунизации необходимо включать не менее трех штаммов одноименной серогруппы (для серогруппы D достаточно двух штаммов). Соответственно, готовят биомассу всех этих штаммов – их музейные культуры (при использовании сухих музейных культур – предварительно регидратированные в бульоне Хоттингера) вносят в пробирки с бульоном Хоттингера, выдерживают 5–6 ч в термостате на шуттель-аппарате (100–140 об./мин при 37°C), после чего для получения маточных культур в зависимости от ростовых особенностей используемых штаммов делают высев либо на агар Хоттингера, либо на сывороточный бульон Хоттингера (вначале во флаконы, из них в бутыли) и инкубируют 18–20 ч при 37°C. Полученные маточные культуры оценивают аналогично оценке селекционированных музейных культур и при положительных резуль-

Таблица. Варианты комплектации набора «Сыворотки диагностические менингококковые адсорбированные для реакции агглютинации»

Table. Options for completing the kit «Diagnostic meningococcal sera adsorbed for the agglutination reaction»

Вариант / Option	Состав сывороток / Serum composition
1	Сыворотки менингококковые А, В, С, X, Y, Z, W-135, 29-E / Meningococcal sera A, B, C, X, Y, Z, W-135, 29-E
2	Сыворотка менингококковая А / Serum meningococcal A
3	Сыворотка менингококковая В / Serum meningococcal B
4	Сыворотка менингококковая С / Serum meningococcal C
5	Сыворотка менингококковая X / Serum meningococcal X
6	Сыворотка менингококковая Y / Serum meningococcal Y
7	Сыворотка менингококковая Z / Serum meningococcal Z
8	Сыворотка менингококковая W-135 / Serum meningococcal W-135
9	Сыворотка менингококковая 29-E / Serum meningococcal 29-E

татах оценки используют для приготовления соответствующих вакцин.

Для иммунизации кроликов используют живые или убитые формалином вакцины.

Маточные культуры, выращенные на агаровой среде, смывают физиологическим раствором, пропускают через марлевый фильтр, центрифугируют 15–25 мин при 4500–5000 об./мин, полученный осадок ресуспендируют в физиологическом растворе.

Бульонные маточные культуры центрифугируют 20–30 мин при 4500–5000 об./мин, полученный осадок ресуспендируют в физиологическом растворе.

Живые вакцины готовят из взвесей, полученных при ресуспендировании осадка бактериальной массы, образующегося при центрифугировании маточных культур, для чего их разводят физиологическим раствором до необходимой концентрации.

Для приготовления убитых формалином вакцин агаровые маточные культуры смывают физиологическим раствором с 1% формалина, выдерживают полученную взвесь 22–24 ч при 18–20°C, после чего ее центрифугируют 20–30 мин при 4500–5000 об./мин и полученный осадок ресуспендируют в свежеприготовленном физиологическом растворе с 1% формалина. При использовании бульонных маточных культур осадок, полученный при их центрифугировании, ресуспендируют физиологическим раствором с 1% формалина и далее обрабатывают по методике, указанной для агаровых культур.

Полученные вакцины должны представлять собой гомогенные взвеси, стандартизованные по оптической плотности, не содержащие посторонней микрофлоры, клетки менингококков должны быть типичны по морфологии и тинкториальным свойствам. Вакцины контролируют на специфичность, специфическую активность и спонтанную агглютинацию. Специфичность проверяется в РА на стекле с диагностическими менингококковыми сыворотками всех серогрупп, для идентификации которых предназначается набор, специфическая активность – в развернутой РА с гомологичными сыворотками в разведениях от 1:10 до 1:160. Спонтанная агглютинация проверяется в РА на стекле с физиологическим раствором. Вакцина считается пригодной для иммунизации кроликов при положительной (++++) РА на стекле с гомологичной сывороткой, отрицательной РА с гетерологичными сыворотками, при отсутствии спонтанной агглютинации с физиологическим раствором и при положительной РА с разведением гомологичной сыворотки не менее 1:40 (для серогрупп В и 29Е – не менее 1:10). Убитые вакцины проверяются также на стерильность высевом на сывороточный агар Хоттингера.

Требования к содержанию и подготовке кроликов к иммунизации те же, что и при производстве других диагностических сывороток из крови иммунизированных кроликов.

Кроликов иммунизируют, вводя вакцины в наружную вену уха, при этом вакцины для серогрупп А, В, С, Х, Y вводят шестикратно (первые пять раз с интервалом 24–48 ч, шестое введение – на 15–16-е сутки от начала процедуры), для остальных серогрупп используют пятикратное введение вакцин с интервалом между инъекциями 24–48 ч. Иммунизацию проводят возрастающими дозами вакцин – от

0,5 до 6,0 млрд микробных тел по оптическому стандарту мутности для всех серогрупп, кроме серогруппы В, для которой максимальная доза составляет 10,0 млрд микробных тел.

Для серогрупп А, С, Х, Y, Z в первых трех инъекциях используют убитые, в последующих – живые вакцины.

Для серогрупп В, D и 29Е животных иммунизируют только живой вакциной, для серогруппы W135 – только формализованной.

Через 5–7 суток после заключительной инъекции у кроликов берут пробу крови из ушной вены для предварительной оценки титра специфических антител, при титре антител к серогруппам А, С, D, Х, Y, Z, W-135 не ниже 1:80, а к серогруппам В и 29Е не ниже 1:20 выполняют производственное кровопускание в два приема – сначала частичное и через сутки тотальное, получая от одного кролика обычно 0,16–0,17 л крови.

Емкости с отобранной кровью (отдельные для каждого кролика) выдерживают 25–35 мин в термостате при 37°C, обводят получившиеся сгустки стеклянной палочкой, емкости помещают на 22–24 ч в холодильную камеру (при 4–8°C) для максимальной ретракции сгустка. Полученную сыворотку от каждого кролика сливают в отдельные емкости, проводят их визуальный контроль и отбраковывают хилезные и сильно опалесцирующие образцы. В отобранных образцах определяют специфичность с использованием гомологичных и гетерологичных штаммов менингококков и специфическую активность. Сыворотки с титром не ниже 1:80 для серогрупп А, С, D, Х, Y, Z, W-135 и не ниже 1:20 для серогрупп В и 29Е сводят в серию, добавляют к ней консервант (мертиолят до концентрации 100 мкг/мл и кислоту борную до концентрации 1,8–2,2%). Серию выдерживают при 4–8°C от 1 до 6 мес.

При производстве сывороток с антителами к отдельным серогруппам менингококков выдержанные сыворотки подвергают адсорбции гетерогенных антител, для чего антисыворотки, предназначенные для идентификации серогрупп Z, 29-Е, Y, W-135 смешивают с микробной массой серогрупп 29-Е, Z, W-135, Y соответственно. При этом биомассу менингококков получают, смывая физиологическим раствором агаровую культуру или ресуспендируя в физиологическом растворе осадок, полученный при центрифугировании бульонной культуры; полученные взвеси центрифугируют и используют осажденную биомассу для адсорбции сывороток. Смеси антисывороток с микробной биомассой шуттелируют 108–132 мин при 37°C, затем выдерживают 18–22 ч при 4–8°C, после чего центрифугированием в течение 20–30 мин при 4500–5000 об./мин отделяют адсорбент.

Адсорбированные сыворотки проверяют на специфичность и специфическую активность, при необходимости адсорбцию повторяют. При положительных оценках специфичности и специфической активности проводят стерилизующую фильтрацию сывороток, после чего контролируют их обсемененность и при необходимости повторяют стерилизующую фильтрацию.

К отфильтрованным сывороткам, предназначенным для выпуска в жидкой форме, добавляют консервант (азид натрия) и хранят их до розлива в герметично закрытых емкостях при 2–8°C. Розлив по флаконам выполняют в асептиче-

ских условиях, флаконы герметично укупоривают стерильными пробками и пластмассовыми навинчиваемыми крышками.

К сывороткам, предназначенным для сушки, добавляют сахарозо-желатиновый агар, разливают сыворотки по флаконам, флаконы неплотно закрывают стерильными пробками для лиофильной сушки, кассеты с флаконами размещают в морозильной камере и выдерживают в ней не менее 24 ч при температуре от -40°C до -80°C. После чего кассеты размещают в камере вакуум-сушильного аппарата и проводят лиофилизацию в соответствии с графиком сушки. По окончании лиофилизации флаконы плотно укупоривают пробками и закрывают навинчиваемыми крышками.

Укупоренные флаконы передают на маркировку, упаковку в групповую тару (коробки с соответствующим комплектом набора), коробки упаковывают в транспортировочную тару, маркируют ее и передают на склад готовой продукции, где хранят до отправки потребителям при 2–8°C.

Конечный продукт – сыворотки в укупоренных и маркированных флаконах, помещенные в маркированную групповую тару, проходят приемочный контроль, в процессе которого оценивается их соответствие требованиям ТУ по физическим свойствам, микробиологической чистоте, специфической активности и специфичности; в лиофилизированных сыворотках оценивается также потеря в массе при высушивании.

Сыворотки, приготовленные по изложенной технологии, успешно прошли технические и клинико-лабораторные испытания, по их результатам для вероятности 0,95 диагностическая чувствительность набора составила не менее 99,3%, а диагностическая специфичность – не менее 97,6%. Набор зарегистрирован Росздравнадзором – Регистрационное удостоверение № РЗН РЗ2021/14887 от 27.07.2021. За время, прошедшее после регистрации, произведено и реализовано уже более 2000 наборов.

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. Менингококковая инфекция у детей (эпидемиология, клиника, диагностика, терапия и профилактика). Методические рекомендации. Под ред. Лобзина ЮВ. СПб.: «Тактик-Студио», 2009.
2. Менингококковая инфекция. Методические рекомендации для студентов, обучающихся последипломного обучения и врачей. Иркутск: ИГМУ, 2004.
3. Абрамцева МВ, Тарасов АП, Немировская ТИ. Менингококковая инфекция. Современные представления о возбудителе, эпидемиологии, патогенезе и диагностике. Сообщение 1. Биопрепараты. 2014;3:4-10.
4. Довнар-Запольская ОН, Манкевич РН, Астапов АА, Кудин АП, Кулагин АЕ. Менингококковая инфекция у детей. Учебно-методическое пособие. Минск: БГМУ, 2019.

5. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году. Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2015.
6. Белобородов ВБ. Нерешенные проблемы менингококковой инфекции. Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2018;7(1):46-53.
7. Лобзин ЮВ, Скрипченко НВ, Горелик ЕЮ, Вильниц АА, Маркова КВ. Менингококковая инфекция у детей как медико-социальная проблема. Поликлиника. 2020;3:43-48.
8. Литусов НВ. Нейссерии. Иллюстрированное учебное пособие. Екатеринбург: «УГМА», 2012.
9. Королева ИС, Белошцкий ГВ, Спирихина ЛВ, Закроева ИМ, Грачева ИМ, Королева МА. Современные особенности менингококковой инфекции. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2006;4(29):16-20.
10. Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2005.
11. Менингококковая инфекция и вакцинопрофилактика. Пресс-релиз. Педиатрическая фармакология. 2016;13(2):207-210.
12. Менингококк. Менингит. Менингококковая инфекция. Менингококкемия. Эпидемиология менингококковой инфекции. Резервуар менингококка [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://meduniver.com/Medical/Microbiology/444.html> (дата обращения: 15.06.2023).
13. Марданлы СГ, Симонов ВВ, Авдонина АС. Производство наборов реагентов для клинической лабораторной диагностики иммунохимическими методами. Орехово-Зуево: ГГТУ, 2017.
14. Черкасова ВЛ, Быковец ИН, Мишуткина ЯВ, Гасанов НБ, Марданлы СГ, Мудрак АД. Применение иммунных сывороток для идентификации эшерихиозных и сальмонеллезных инфекций. В сборнике: Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации. Под общ. ред. Марданлы СГ, Помазанова ВВ, Киселёвой ВА. Орехово-Зуево: ГГТУ, 2017;258-260.
15. Марданлы СГ, Мишуткина ЯВ. Потребительские характеристики сывороток диагностических сальмонеллезных и эшерихиозных сухих и жидких. В сборнике: Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации. Под общ. ред. Марданлы СГ, Помазанова ВВ, Киселёвой ВА. Орехово-Зуево: ГГТУ, 2018;123-128.
16. Марданлы СГ, Мишуткина ЯВ, Ротанов СВ, Быковец ИН. Диагностические материалы для серотипирования возбудителей бактериальных кишечных инфекций. В сборнике: Современные аспекты лабораторной диагностики и инноваций в медицине. Под общ. ред. Марданлы СГ. Орехово-Зуево: ГГТУ, 2018;40-45.
17. Мудрак АД, Марданлы СГ. Мониторинг гемофильных инфекций и разработка диагностических наборов для сероидентификации *Haemophilus influenzae*. В сборнике: Современные аспекты лабораторной диагностики и инноваций в медицине. Под общ. ред. Марданлы СГ. Орехово-Зуево: ГГТУ, 2018;54-56.

References

1. Meningococcal infection in children (epidemiology, clinic, diagnosis, therapy and prevention): Methodological recommendations. Ed. by Lobzin YuV. Saint Petersburg: Taktik-Studio, 2009. (In Russian).
2. Meningococcal infection. Methodological recommendations for postgraduate students and doctors. Irkutsk: IGMU, 2004. (In Russian).
3. Abramceva MV, Tarasov AP, Nemirovskaja TI. Meningococcal infection. Modern ideas about the pathogen, epidemiology, pathogenesis and diagnosis. Message 1. Biopreparaty. 2014;3:4-10. (In Russian).
4. Dovnar-Zapol'skaja ON, Mankevich RN, Astapov AA, Kudin AP, Kulagin AE. Meningococcal infection in children: educational and methodical manual. Minsk: BGMU, 2019. (In Russian).

5. On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2014. State report. Moscow: Federal'naja sluzhba po nadzoru v sferе zashchity prav potrebitel'ej i blagopoluchija cheloveka; 2015. (In Russian).
6. Beloborodov VB. Unresolved problems of meningococcal infection. Infectious Diseases: News, Opinions, Training. 2018;7(1):46-53. (In Russian).
7. Lobzin YuV, Skripchenko NV, Gorelik EYu, Vil'nic AA, Markova KV. Meningococcal infection in children as a medical and social problem. Poliklinika. 2020;3:43-48. (In Russian).
8. Litusov NV. Neisseries. Illustrated tutorial. Ekaterinburg: «UGMA», 2012. (In Russian).
9. Koroleva IS, Beloshtcky GV, Spirihina LV, Zakroeva IM, Gracheva IM, Koroleva MA. Modern features of meningococcal infection. Jepidemiologija i vakcinoprofilaktika. 2006;4(29):16-20. (In Russian).
10. Laboratory diagnostics of meningococcal infection and purulent bacterial meningitis: Guidelines. Moscow: Federal'nyj centr gigeny i jepidemiologii Rospotrebnadzora, 2005. (In Russian).
11. Meningococcal infection and vaccination. Press release. Pediatricheskaja farmakologija. 2016;13(2):207-210. (In Russian).
12. Meningokokk. Meningit. Meningokokkovaya infektsiya. Meningokokkemiya. Epidemiologija meningokokkovoy infektsii. Rezervuar meningokokka [Elektronnyj resurs]. Available at: <https://meduniver.com/Medical/Microbiology/444.html> (access date: 06/15/2023). (In Russian).
13. Mardarly SG, Simonov VV, Avdonina AS Production of reagent kits for clinical laboratory diagnostics by immunochemical methods. Orekhovo-Zuevo: GGTU, 2017. (In Russian).
14. Cherkasova VL, Bykovec IN, Mishutkina YaV, Gasanov NB, Mardarly SG, Mudrak AD. The use of immune serums for the identification of Escherichia and Salmonella infections. In the collection: Perspektivy vnedrenija innovacionnyh tehnologij v medicine i farmacii. Under the general editorship of Mardarly S.G., Pomazanov V.V., Kiseleva V.A.. Orekhovo-Zuevo: GGTU, 2017;258-260. (In Russian).
15. Mardarly SG, Mishutkina YaV. Consumer characteristics of diagnostic salmonella and escherichia sera dry and liquid. In the collection: Perspektivy vnedrenija innovacionnyh tehnologij v medicine i farmacii. Under the general editorship of Mardarly SG, Pomazanov VV, Kiseleva VA. Orekhovo-Zuevo: GGTU, 2018;123-128. (In Russian).
16. Mardarly SG, Mishutkina YaV, Rotanov SV, Bykovec IN. Diagnostic materials for serotyping pathogens of bacterial intestinal infections. In the collection: Sovremennye aspekty laboratornoj diagnostiki i innovacij v medicine. Under the general editorship of Mardarly SG. Orekhovo-Zuevo: GGTU, 2018;40-45. (In Russian).
17. Mudrak AD, Mardarly SG. Monitoring of hemophilic infections and development of diagnostic kits for seroidentification of Haemophilus influenzae. In the collection: Sovremennye aspekty laboratornoj diagnostiki i innovacij v medicine. Under the general editorship of Mardarly SG. Orekhovo-Zuevo: GGTU, 2018;54-56. (In Russian).

Информация о соавторах:

Марданлы Сейфаддин Гашимович, доктор медицинских наук, заслуженный работник здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет», директор по науке, президент компании ЗАО «ЭКОлаб»

Мамедова Эльвира Асафовна, начальник НПО иммунологии ЗАО «ЭКОлаб»

Information about co-authors:

Seifaddin G. Mardarly, MD, PhD, DSc., Honored Healthcare Worker of the Russian Federation, Professor of the Department of Pharmacology and Pharmaceutical Disciplines, State University of Humanities and Technology, Director for Science, President of EKOLab CJSC

Elvira A. Mamedova, Head of the Immunology Research and Production Association of Closed Joint Stock Company "ECOLab"

Индустрия здравоохранения будущего: чего ожидать в ближайшие 50 лет

Исследование, проведенное исследователями из Университета Мелардален (MDU), описывает, как может выглядеть наша будущая индустрия здравоохранения.

По мнению исследователей, значимыми тенденциями и факторами, которые, как ожидается, повлияют на развитие здравоохранения и медицинской помощи в течение следующих 50 лет, являются:

Технологии социального обеспечения окажут влияние на отрасль в краткосрочной перспективе благодаря использованию искусственного интеллекта, робототехники и телемедицины.

Более эффективное лечение посредством ориентированного на пациента и индивидуального ухода окажет влияние в краткосрочной и среднесрочной перспективе.

Изменение климата, непредвиденные факторы и глобальные угрозы, такие как пандемии и войны, – это факторы, которые могут оказать влияние в среднесрочной и долгосрочной перспективе.

Повышенное внимание к устойчивому развитию с использованием более экологически чистых методов и меньшего воздействия на климат является решающим фактором развития.



Healthcare industry of the future: What to expect in the next 50 years.

Available at: <https://www.news-medical.net/news/20230704/>

[Healthcare-industry-of-the-future-What-to-expect-in-the-next-50-years.aspx](https://www.news-medical.net/news/20230704/Healthcare-industry-of-the-future-What-to-expect-in-the-next-50-years.aspx)

Материалы VIII Национального конгресса бактериологов (дополнение)

Москва, 27–28 сентября 2023 г.

Изучение нового химиотерапевтического средства для лечения инфекционных заболеваний

Ю.А.Буковская¹, В.А.Гостев², Т.Ф.Черных¹,
И.И.Генералов³

¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

²ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

³ФГБОУ ВО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» Министерства здравоохранения Республики Беларусь, Витебск, Республика Беларусь

Ускоренный темп развития резистентности микроорганизмов не позволяет своевременно создавать новые анти-микробные препараты. Устойчивость микроорганизмов к противомикробным агентам, согласно данным Всемирной организации здравоохранения, представляет большую угрозу для человечества. Во всем мире от инфекционной патологии погибает огромное количество людей, причиной смертей которых являются резистентные формы микроорганизмов. Перспективными соединениями, обладающими различными биологическими эффектами (антибактериальным, противогрибковым, противомаларийным, противоопухолевым, противовоспалительным, антиоксидантным, антигистаминным), являются производные ксантона (Kye-Simeon Masters et al., 2012).

В лаборатории органического синтеза Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета получают новые продукты, производные 4,4а-дигидроксантона и их модификации (Chernov N.M. et al., 2017).

Цель исследования. Изучение эффективности нового продукта органического синтеза – производного ксантона 4,4а-дигидроксантон – в отношении стандартных и резистентных штаммов микроорганизмов, а также определение острой и хронической токсичности фармакологической субстанции.

Материалы и методы. Исследовали стандартные штаммы *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* и *Aspergillus niger* методами се-

рийного разведения и диффузии в агар на соответствующих (дифференциально-диагностических и элективных) питательных средах. В качестве препаратов сравнения служили антибиотики ванкомицин, обладающий выраженной антистафилококковой активностью, и доксицилин, схожий по структуре с дигидроксантонами.

В исследование также включена коллекция микроорганизмов, выделенных у пациентов при инфекциях нижних дыхательных путей, кровотока, а также кожи и мягких тканей. Штаммы собраны в 2011–2020 гг. из 30 медицинских центров в 11 городах России. Реидентификацию восстановленных суточных культур, выращенных на кровяном агаре, проводили с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex LT с использованием программного обеспечения Biotyper (Bruker Daltonics, Германия). Коллекция депонирована в ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, г. Санкт-Петербург. Чувствительность к исследуемому образцу оценивали методом серийных микроразведений с определением минимальной подавляющей концентрации (МПК) в бульоне Mueller-Hinton (Bio-Rad, Франция) в соответствие с международным стандартом ISO 20776-1:2019. Для анализа результатов МПК использовали платформу WHONET 2020 (версия 20.17.5). Рассчитывали следующие параметры: распределение и диапазон МПК, МПК50, МПК90, средняя геометрическая МПК (МПКСГ).

Результаты. Было доказано, что производное 4,4а-дигидроксантон обладает малой активностью в отношении исследованных грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов (МЦК 125–250 мкг/мл), дрожжевых и мицелиальных грибов (МФК – 3,9–7,8 мг/мл). При исследовании антимикробного действия в отношении *S. aureus* установлено, что соединение оказывало выраженное статическое (МСК – 2 мкг/мл) и микробицидное (МЦК – 4 мкг/мл) антистафилококковое действие, идентичное с активностью ванкомицина (МЦК – 2 мкг/мл) и превышающее активность антибиотика доксицилина (МЦК – 8 мкг/мл). Препараты сравнения являлись стандартными образцами для анализа (хчда).

При исследовании к неповторяющимся клиническим изолятам метициллинрезистентных *S. aureus* ($n = 162$), метициллинрезистентных *Staphylococcus epidermidis* ($n = 47$), ванкомицин-резистентных *Enterococcus faecium* ($n = 90$), положительным по гену *mecA* и устойчивым к цефокситину, установлено, что МПК50 и МПК90 составляли 32–64 мкг/мл и 128 мкг/мл соответственно для всех анализируемых групп

микроорганизмов. Низкая активность рассматриваемого соединения может быть связана с недостаточной его очисткой. Тем не менее, ввиду низкой токсичности (III класс опасности), данное соединение может быть использовано для химической модификации при получении более эффективных соединений-дериватов с высоким уровнем антимикробной активности.

Заключение. Определена антимикробная активность производного ксантона 4,4а-дигидроксантон в отношении музейных и резистентных клинических штаммов микроорганизмов. Установлено, что в опытах *in vitro* данное соединение обладает высокой активностью к *S. aureus* (МСК – 2 мкг/мл, МЦК – 4 мкг/мл), идентичной активности ванкомицина и превышающей активность доксицилина, и низкой активностью к клиническим изолятам метициллинрезистентных *S. aureus*.

Исследуемое соединение относится к малотоксичным соединениям. Исследования продолжаются.

Сравнение показателей эффективности методов диагностики лептоспирозов в разные сроки с момента заболевания

А.П.Самсонова^{1,2}, Е.М.Петров¹

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация;

²ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова (Сеченовский университет)» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Лептоспирозы занимают одно из ведущих мест среди зоонозов по широте распространения природных и хозяйственных очагов, а также тяжести клинического течения инфекции. По оценкам международных экспертов, ежегодно в мире более 100 000 человек заболевают этими инфекциями. В последние годы в России на территории более чем 50 субъектов показатель заболеваемости лептоспирозами людей колебался от 0,43 до 1,63 на 100 000 населения. Низкие показатели или отсутствие регистрируемой заболеваемости на некоторых территориях России, как правило, являются следствием недостаточного объема или неудовлетворительного состояния дифференциальной клинической и лабораторной диагностики (Ананьина Ю.В., 2015). Целью нашей работы явилось сравнение диагностических показателей полимеразной цепной реакции (ПЦР) и реакции микроагглютинации (РМА) при одновременном исследовании с помощью этих методов образцов сывороток крови больных, подозрительных на заболевание лептоспирозами. Исследовали 303 образца сывороток крови, взятых от людей при спорадических случаях и вспышках лептоспирозов в различных регионах на территории России (Центральный, Южный, Приволжский, Уральский федеральные округа) и на территории Китайской Народной Республики (провинция Хунань). Исследования проводились двойным слепым методом: образцы были зашифрованы под номерами, РМА и ПЦР ставились параллельно разными сотрудни-

ками. Расчет диагностических показателей производили по формулам (Меньшиков В.В., 1989). Согласно полученным нами результатам, диагностическая эффективность (ДЭ) ПЦР выше, чем у РМА, в более ранние сроки с момента заболевания – 1-я – начало 2-й недели (в период лептоспиремии). В то же время ДЭ РМА увеличивается и становится выше, чем у ПЦР, в более поздние сроки с появлением и накоплением противолептоспирозных антител. Таким образом, использование последовательно двух диагностических методов позволяет повысить эффективность диагностики у пациентов, подозрительных на заболевание лептоспирозами. Важно отметить, что отрицательные результаты, полученные при исследовании методом ПЦР в ранние сроки с момента заболевания, не являются основанием для прекращения диагностического поиска, а требуют продолжения исследования методом РМА в более поздние сроки. И наоборот, при серонегативных случаях, которые часто бывают при тяжелом течении заболевания, применение ПЦР может помочь выявить наличие персистенции лептоспир в крови больных в более поздние сроки с момента заболевания, что наблюдается, например, в случае лептоспироза *Icterohaemorrhagiae*.

Источник финансирования: Госзадание № 056-00119-21-01 (сроки – 2021–2023 гг.).

Влияние биоты почвы на *Bacillus anthracis*

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

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

Биота почвы – это сложное сообщество микроорганизмов и их фагов, растений, геобионтов, простейших, которые тесно взаимодействуют друг с другом. Почву населяют разные виды микроорганизмов, в т.ч. опасные для человека. Почва является основным резервуаром возбудителя сибирской язвы и основным фактором, поддерживающим непрерывность эпизоотического процесса в очагах инфекции. Считается вполне доказанной возможность непосредственного заражения животных и людей от почвы. В работе проведен анализ влияния факторов почвы сибиреязвенного скотомогильника на жизнеспособность и изменчивость свойств возбудителя сибирской язвы. Опасность сибирской язвы связана с длительной выживаемостью споровой формы возбудителя в окружающей среде. При этом устойчивость и длительность выживания возбудителя сибирской язвы зависят от многих факторов, к числу которых следует отнести форму клеток. Микроб в вегетативной форме характеризуется обычной резистентностью, свойственной другим бактериям. Споры отличаются исключительной устойчивостью.

В связи с этим проблема экологической опасности сибиреязвенных скотомогильников и отдельных захоронений актуальна и напрямую связана со способностью возбудителя образовывать спорую форму, обеспечивающую длительное сохранение не только жизнеспособности, но и виру-

лентности. Во время нахождения в почве сибиреязвенный микроб подвергается воздействию различных факторов. Он имеет много антагонистов среди растений и микроорганизмов, контактирует с другими микроорганизмами, амебами, червями. Длительное пребывание и вегетирование возбудителя сибирской язвы в почве при соответствующих условиях приводит к постепенным изменениям его свойств, что показано в наших исследованиях. При определенных условиях возбудитель, независимо от степени вирулентности, может пройти цикл развития от споры через вегетацию к образованию нового поколения спор. Продолжительное развитие возбудителя в почве, особенно в неблагоприятных условиях, сопровождается изменением его свойств и появлением вариантов с разной вирулентностью. Изменения свойств можно объяснить протеканием жизненного цикла возбудителя в почве, который состоит из нескольких стадий: попадания микроба в организм восприимчивого животного, раз-

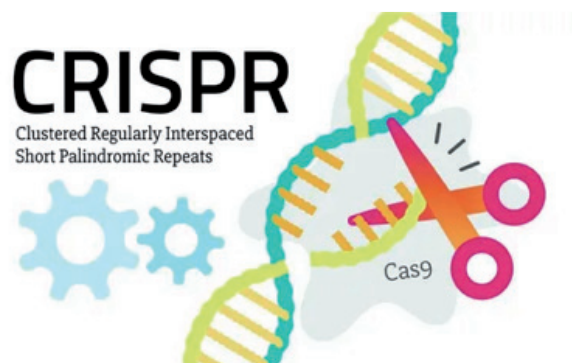
множения в нем, убийство хозяина и выход во внешнюю среду, где бациллы спорулируют, фиксируя высокую степень вирулентности.

Нами проведено изучение микробного профиля почвы старого сибиреязвенного скотомогильника, существующего более 70 лет на берегу Ивановского водохранилища в Конаковском районе Тверской области. Исследования показали, что большая часть микробной популяции представлена грамположительными спорообразующими палочками (около 60%), неспорообразующими палочками (около 20%), оставшаяся часть – стафилококки и кишечная палочка. Микробиологический анализ показал присутствие в почве скотомогильника сибиреязвенного микроба. Это свидетельствует о том, что сибиреязвенные скотомогильники или сибиреязвенные захоронения представляют угрозу экологической безопасности.

НОВОСТИ НАУКИ

Прогнозирование целевой и нецелевой активности направляющих РНК CRISPR-Cas13d с использованием глубокого обучения

Применение транскриптомной инженерии в живых клетках с эффекторами CRISPR, нацеленными на РНК, зависит от точного прогнозирования целевой активности и предотвращения нецелевой активности. Разработано и протестировано около 200 000 направляющих РНК RfxCas13d, нацеленных на важные гены в клетках человека, с систематически создаваемыми несоответствиями, вставками и делециями (инделами). Обнаружено, что несоответствия и вставки оказывают зависимое от положения и контекста влияние на активность Cas13d, а несоответствия, которые приводят к колебательным парам G-U, переносятся лучше, чем другие одноосновательные несоответствия. Используя этот крупномасштабный набор данных, исследователи обучают сверточную нейронную сеть (специальная архитектура искусственных нейронных сетей, нацеленная на эффективное распознавание образов) которую назвали целевым ингибированием экспрессии генов посредством дизайна гРНК (TIGER), для прогнозирования эффективности на основе направляющей последовательности и контекста. TIGER превосходит существующие модели в прогнозировании целевой и нецелевой активности в данном наборе данных и опубликованных наборах данных. Показано, что оценка TIGER в сочетании со специфическими несоответствиями дает первую общую основу для модуляции экспрессии транскриптов, что позволяет использовать CRISPR, нацеленные на РНК, для точного контроля дозировки генов.



*Wessels HH, Stirn A, Méndez-Mancilla A, et al.
Prediction of on-target and off-target activity of CRISPR-Cas13d guide RNAs using deep learning.
Nat Biotechnol. 2023 Jul 3. DOI: 10.1038/s41587-023-01830-8*

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