

# БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2024 • ТОМ 9 • №1

ISSN 2500-1027

# БАКТЕРИОЛОГИЯ

Научно - практический журнал

## Главный редактор

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

## Ответственный секретарь

И.Г.Говорунов, к.б.н.  
(Россия)

## Редакционный совет

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

## Редколлегия

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

## Учредитель

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

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

### Адрес учредителя и редакции:

142279, Московская область,  
г.о. Серпухов, р.п. 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 29.03.2024 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

К вопросу ускоренного выявления токсических продуктов в объектах внешней среды и биологических пробах. . . . . **5**

## Экспериментальные статьи

Многоцентровое исследование по выявлению резистентности к антибактериальным препаратам стрептококка группы В в акушерских стационарах  
И.Э.Григорян, Т.В.Припутневич, Н.Е.Кан, Б.О.Бембеева, А.Б.Гордеев. . . . . **8**

Оценка генотоксичности почв, загрязненных несимметричным диметилгидразином (гептилом) и авиационным керосином  
Г.А.Жариков, А.И.Марченко, М.Г.Жариков, Л.В.Коломбет. . . . . **15**

Особенности стратифицированных показателей девайс-ассоциированных инфекций в отделениях реанимации и интенсивной терапии для пациентов с COVID-19  
Л.А.Любасовская, Н.А.Карпун, С.Н.Галкина, А.С.Рыбалко, Ю.А.Персова, Е.А.Золотова, М.Ю.Персов, О.Ю.Филимонова, А.В.Тутельян, С.В.Сметанина. . . . . **22**

Оценка показателей качества экспериментальных серий вакцины чумной живой, полученных методом глубинного культивирования  
А.В.Костроминов, С.Е.Гостищева, Н.В.Абзаева, Г.Ф.Иванова, А.А.Фисун, М.А.Иванова. . . . . **30**

Влияние антибактериальных препаратов в свободной и липосомальной формах на отдельные показатели иммунного статуса экспериментальных животных  
А.А.Ефременко, И.А.Базилов, Д.В.Ефременко, О.В.Логвиненко, Е.Л.Ракитина, Ф.И.Базилов, В.И.Ефременко. . . . . **38**

Исследования микробиоты кишечника у обезьян разного возраста  
В.И.Полякова, И.М.Аршба. . . . . **46**

Детекция генов вирулентности некоторых представителей порядка *Flavobacteriales*, выделенных от пациентов с муковисцидозом  
К.В.Зубова, В.А.Кузнецова, М.В.Каневский, О.В.Кондратенко, Е.В.Глинская, Д.М.Голубев. . . . . **52**

Изучение кишечной микробиоты методом культуромики  
Б.О.Бембеева, Е.Л.Исаева, В.В.Муравьева, К.Н.Жигалова, Р.В.Изюмов, О.В.Нечаева, Т.В.Припутневич. . . . . **58**

Опыт изоляции *Coxiella burnetii* из сывороток крови больных с использованием клеточных линий и биопробных животных  
В.В.Евдокимова, Д.И.Симакова, Л.П.Алексеева, Д.А.Левченко, М.Г.Мелоян, Е.Н.Сокиркина. . . . . **63**

IS-генотипирование штаммов *Yersinia pestis* с помощью полимеразной цепной реакции  
А.Л.Трухачев, М.Г.Мелоян, А.С.Водопьянов, О.Н.Подладчикова, А.А.Ковалевич, С.Ю.Темякова, Р.В.Писанов, Д.А.Кузнецова, В.А.Рыкова, Г.Х.Базарова, А.Ю.Югушев, Е.Н.Рождественский, А.К.Носков. . . . . **72**

Анализ генетических детерминант антибиотикорезистентности *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> и *bla*<sub>OXA-48</sub>, выделенных из штаммов, входящих в группу ESCAPE  
А.В.Устюжанин, Г.Н.Чистякова, И.И.Ремизова, А.Э.Первушина, А.П.Шитова, А.А.Маханёк. . . . . **81**

## Обзорные статьи

Современные аспекты генетической организации *Pseudomonas aeruginosa* как одного из возбудителей внебольничных и нозокомиальных пневмоний  
А.А.Ковалевич, А.С.Водопьянов, Р.В.Писанов. . . . . **87**

Генетическая стабильность бактериальных культур в процессе хранения  
А.Ю.Лебедева, А.Е.Соломенцева, М.Р.Барькова, Н.А.Сухаричева. . . . . **95**

Микробиологические маркеры риска развития несостоятельности швов после кесарева сечения  
Д.В.Старикова, Л.В.Коломбет, Н.В.Богачева. . . . . **105**

## Памяти коллеги

Памяти Игоря Георгиевича Шемякина. . . . . **109**

Правила оформления статей (основные положения). . . . . **110**

# 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

Accelerated detection of toxic products in environmental objects and biological samples . . . . .	5
---	---

---

## Experimental Articles

A multicenter study to identify antibiotic resistance of group B streptococcus in obstetric hospitals <i>I.E.Grigorian, T.V.Priputnevich, N.E.Kan, B.O.Bembeeva, A.B.Gordeev</i> . . . . .	8
---	---

Evaluation of the genotoxicity of soils polluted with asymmetric dimethylhydrazine (heptil) and aviation kerosene <i>G.A.Zharikov, A.I.Marchenko, M.G.Zharikov, L.V.Kolombet</i> . . . . .	15
---	----

Features of stratified indicators of device-associated infections in intensive care units for patients with COVID-19 <i>L.A.Lyubasovskaya, N.A.Karpun, S.N.Galkina, A.S.Rybalko, Yu.A.Persova, E.A.Zolotova, M.Yu.Persov, O.Yu.Filimonova, A.V.Tutelyan, S.V.Smetanina</i> . . . . .	22
---	----

The analysis of the quality of experimental batches of live plague vaccine obtained by submerged cultivation method <i>A.V.Kostrominov, S.E.Gostishcheva, N.V.Abzaeva, G.F.Ivanova, A.A.Fisun, M.A.Ivanova</i> . . . . .	30
---	----

Effect of antibacterial preparations in free and liposomal forms on individual indicators of immune status of experimental animals <i>A.A.Efremenko, I.A.Bazikov, D.V.Efremenko, O.V.Logvinenko, E.L.Rakitina, F.I.Bazikov, V.I.Efremenko</i> . . . . .	38
--	----

Studies of gut microbiota in monkes of different ages <i>V.I.Polyakova, I.M.Arshba</i> . . . . .	46
---	----

Analysis of virulence genes of some representatives of the order <i>Flavobacteriales</i> isolated from patients with cystic fibrosis <i>K.V.Zubova, V.A.Kuznetsova, M.V.Kanevsky, O.V.Kondratenko, E.V.Glinskaya, D.M.Golubev</i> . . . . .	52
--	----

Study of intestinal microbiota by culturomics <i>B.O.Bembeeva, E.L.Isaeva, V.V.Muravieva, K.N.Zhigalova, R.V.Izyumov, O.V.Nechaeva, T.V.Priputnevich</i> . . . . .	58
---	----

Experience with isolation of <i>Coxiella burnetii</i> from patient sera using cell lines and bioassay animals <i>V.V.Evdokimova, D.I.Simakova, L.P.Alekseeva, D.A.Levchenko, M.G.Meloyan, E.N.Sokirkina</i> . . . . .	63
--	----

IS-genotyping of <i>Yersinia pestis</i> strains using PCR <i>A.L.Trukhachev, M.G.Meloyan, A.S.Vodopyanov, O.N.Podladchikova, A.A.Kovalevich, S.Yu.Temyakova, R.V.Pisanov, D.A.Kuznetsova, V.A.Rykova, G.Kh.Bazarova, A.Yu.Yugushev, E.N.Rozhdestvensky, A.K.Noskov</i> . . . . .	72
---	----

Analysis of genetic determinants of antibiotic resistance <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM</sub> и <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> isolated from strains included in the ESKAPE group <i>A.V.Ustyuzhanin, G.N.Chistyakova, I.I.Remizova, A.E.Pervushina, A.P.Shitova, A.A.Makhanyok</i> . . . . .	81
--	----

---

## Review Articles

Modern aspects of the genetic organization of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> as one of the pathogens of community-acquired and nosocomial pneumonia <i>A.A.Kovalevich, A.S.Vodopyanov, R.V.Pisanov</i> . . . . .	87
--	----

Genetic stability of microbial cultures in preservation <i>A.Yu.Lebedeva, A.E.Solomentseva, M.R.Barkova, N.A.Sukharicheva</i> . . . . .	95
--	----

Microbiological markers of the risk of suture failure after cesarean section <i>D.V.Starikova, L.V.Kolombet, N.V.Bogacheva</i> . . . . .	105
---	-----

---

## Obituary

In memory of Igor Georgievich Shemyakin . . . . .	109
---	-----

Instructions for Authors . . . . .	110
------------------------------------	-----

## К вопросу ускоренного выявления токсических продуктов в объектах внешней среды и биологических пробах

**В** распоряжении исследователей и практических лабораторий имеется большой арсенал методов оценки наличия в исследуемом материале токсичных для человеческого организма веществ и их идентификации.

ФБУН ГНЦ ПМБ в своей практической работе по расшифровке вспышек инфекционных болезней и проявлений токсических состояний, вызванных токсинами биологического происхождения, использует многие из этих методов, что приносит в большинстве случаев положительный результат.

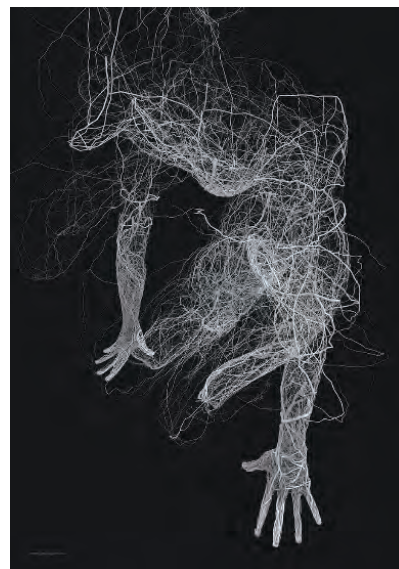
В 2010 г., при разработке проблемы оценки безопасности наноматериалов в рамках кампании по развитию нанотехнологий, большим количеством учреждений был создан документ: «Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов» Методические указания МУ 1.2.2635–10, 122 с. В нем были собраны практически все известные и используемые на практике методы оценки токсичности различных молекул и объектов, которые предлагалось применять при оценке наноматериалов. По существу, эти методики были разработаны ранее и применяются сейчас для оценки любых объектов (проб), предположительно содержащих токсические продукты для людей. Появились также новые высокоэффективные подходы.

Для индикации наличия токсинов в пробах, предполагающей ускоренное, в течение одного часа, определение факта токсичности, из этих методов на сегодняшний день можно использовать только 2–3, и то при целенаправленной доработке и апробации.

По прошествии более 12 лет с момента выхода данных методических указаний появилось крайне мало новых подходов к идентификации и индикации токсинов. В частности, развился метод масс-спектрометрии, позволяющий идентифицировать токсины по структуре молекулы не только в чистом виде, но и в загрязненных пробах и даже срезах тканей. Существующие международные базы данных являются основой для такой идентификации. ГНЦ ПМБ располагает таким суперсовременным оборудованием и взаимодействует с НИУ РАН в г. Пущино, где также есть необходимые приборы и базы. Однако такое оборудование может быть использовано только для финальной идентификации, а не индикации.

Из имеющихся и освоенных в свое время в ГНЦ ПМБ методов определения фактора острой токсичности для индикации могут быть использованы только два: метод биопроб на лабораторных животных и метод с использованием живого биообъекта (инфузория туфелька). Инфузории типа *Tetrahymena piriformis*, *Paramecium caudatum*, *Stylonychia mytilus* имеют сходство с высшими животными по ряду основных параметров обмена веществ, поэтому используются для ускоренного выявления токсинов (ГНЦ ПМБ проводил ранее такие работы). Преимущества их перед другими живыми организмами заключается в том, что агент в водной среде воздействует на инфузорию не только изнутри, вследствие его заглатывания и переваривания, но и снаружи, так как частично, в отличие от высших животных, инфузория питается путем всасывания через свои мембраны, покрытые многочисленными порами, простых пищевых веществ (аминокислоты, соли, витамины). На эти же оболочки действуют и токсины, присутствующие в исследуемом продукте. В результате не только резко сокращается время выявления токсического действия образца, но и возрастает чувствительность к минимальным концентрациям агента, не улавливаемым организмом высших животных, имеющих более мощные механизмы защиты от многих вредных факторов внешней среды.

Инфузории хорошо существуют в среде, где есть плотные частицы, в связи с чем стерилизованное и ультрапастеризованное молоко является хорошей питательной средой ввиду того, что в процессе высоко-



температурной обработки продукта происходит коагуляция белка, имеющего вид плотных частиц. Липиды, витамины, глюкоза такими стимулирующими свойствами не обладают. Основные методические подходы при оценке токсичности на инфузориях описаны в Методических указаниях к проведению биологической оценки кормов и пищевых продуктов (А.Д.Игнатьев и др., Москва, 1980).

Из всего массива литературы по данному вопросу видно, что есть множество модификаций и подходов к реализации этих методов, однако универсального, широко распространенного подхода нет.

Множество других методов определения токсичности, связанных, например, с использованием культур клеток, макрофагов, тестов на цитотоксичность типа «анализ нейтрального красного», «МТТ-тест», «активность лактатдегидрогеназы» и прочих, не подходят для индикационных исследований в широкой практике в силу высокой сложности и длительности процедур.

В связи с этим разработка направления по индикации и дальнейшей идентификации возможного токсичного агента в различных пробах (вода, пища, биологические жидкости) может быть связана с разработкой общей, доступной для практических лабораторий аналитической схемы. Эта схема должна базироваться на стандартизованных методах первичного определения острой токсичности исследуемого материала, причем не исключена возможность разработки принципиально новых методов детекции токсичности при использовании других биомоделей, что потребует интенсивных поисковых исследований.

Одним из направлений выявления токсинов в пробах является использование микроорганизмов, «обличителей токсинов», которые реагируют на очень низкие концентрации содержания токсинов в пробах. Такие разработки проводились за рубежом, и в ГНЦ ПМБ испытывалась канадская тест-система для выявления токсинов в воде, основанная на нескольких индикаторных микроорганизмах, которая показала хорошие результаты. Однако отсеять эти культуры для дальнейшего использования не удалось, так как они росли только в одной генерации. Проблема сложная, но современными генетическими методами может быть решена.

Следует также иметь в виду, что токсины могут вызывать хронические поражения клеток и тканей организма и методами биопроб в экстренных индикационных экспериментах их выявить не удастся.

Проблемы, связанные с дальнейшей идентификацией самого токсина, могут быть решены только на основе определения химической или биологической природы токсина.

В отношении идентификации биологических токсинов ГНЦ ПМБ имеет все возможности для создания линейки препаратов и методов их выявления на основе моноклональных антител (в различных вариантах биодетекции) и масс-спектрометрического анализа. Количество моноклональных антител по видам токсинов может быть существенно увеличено, так как технология их получения поставлена и работает в постоянном режиме.

Из наиболее важных для биологической безопасности токсинов следует отметить холерный токсин, шигатоксин второго типа, ботулотоксин, рицин, пять стафилококковых токсинов, летальный токсин сибирской язвы и другие хорошо известные токсины.

Следует иметь в виду, что в террористических или военных целях могут быть использованы и другие, отличные от этих распространенных, пищевые токсины из природных источников (растения, грибы, моллюски, рыбы и др.), которые могут быть в настоящее время достаточно легко клонированы и получены в больших количествах с использованием микробных штаммов-продуцентов. К таким природным токсинам относятся: Ciguatoxin, Shellfish toxins (PSP, DSP, NSP, ASP, AZP), Scombrototoxin, Tetrodotoxin, Mushroom toxins, Aflatoxins, Gempylotoxin, Pyrrolizidine alkaloids, Venomous fish, Grayanotoxins, Phytohaemagglutinin. Для этих групп токсинов в нашей стране практически отсутствуют тест-системы для идентификации, а тем более средства купирования вызванных ими состояний.

Сравнение токсичности (по медиане смертельной дозы – LD<sub>50</sub> в мкг/кг для лабораторных мышей) более 20 известных токсинов различного происхождения, включая протеотоксины, а также низкомолекулярные токсины, показывает, что токсичность варьирует в широком диапазоне: 0,001–0,002 (ботулотоксин, шигатоксин 2, тетанус, SEB), 0,1 (дифтерийный токсин), 0,1–5 (*Clostridium perfringens*), 0,7 (абрин), 3,0 (рицин), 8,0 (Tetrodotoxin), 100,0 (аконитин), 1200 (Т-2). Механизмы действия токсинов и мишени клеток млекопитающих также сильно отличаются.

Вследствие этого задача по индикации токсинов (без использования животных моделей) в окружающей среде и пищевых продуктах представляется чрезвычайно сложной. Новые разрабатываемые методы индикации токсинов должны отличаться высокой чувствительностью, специфичностью, автономностью, быстротой, удобством в применении, производительностью и низкой себестоимостью.

В последние годы для индикации токсинов используются автономные мультиплексные платформы, основанные главным образом на иммунохимических методах в форматах иммунохроматографии, иммуночипов и различных типов биосенсоров (электрохимические, иммуноферментные и иммунофлуоресцентные).

Завершенной разработкой в области биодетекции токсинов является портативный детектор патогенов фирмы Bruker – pBDi. Это открытая детекционная платформа способная одновременно определять до

6 патогенов/токсинов в концентрациях от 0,1–2 нг токсина/мл или  $10^{2-3}$  вирусных частиц или бактерий в пределах 20 мин с минимальной пробоподготовкой в течении 5 мин. В основе механизма детектирования лежит иммуноферментная реакция, происходящая на аноде и катоде электрохимического чипа, в результате которой генерируется электрический ток. Токсичный чип 1 способен детектировать BoNT/A, BoNT/B, BoNT/F, SEB и ricin, а чип 2 – BoNT/C, BoNT/D, BoNT/E, SEA и abrin. По показателям данный детектор в основном соответствует требованиям к средствам индикации белковых токсинов.

Недостатком этой платформы с точки зрения реализации в современных условиях является необходимость использования слабо освоенных в стране технологий микрофлюидики и электрохимического чипа, а также разработки нового прибора.

Другая весьма перспективная платформа использует наномангнитные частицы и метку в виде редкоземельных металлов с флуоресценцией, разрешенной во времени, в формате иммунохроматографии. Выбранный формат иммунологического анализа на низкомолекулярные токсины – конкурентный иммунологический анализ. Мультиплексирование достигается за счет использования наночастиц разной окраски. Снижение интенсивности цвета при положительном обнаружении наблюдается невооруженным глазом. Например, уровни детекции с использованием этого многоцветного экспериментального иммунохимического анализа определялись как 0,5; 2 и 30 нг/мл для афлатоксина В1, зеараленона или Т-2-токсина соответственно. Включение в процедуру анализа портативного детектора и флуоресцентной TRF-метки позволит увеличить чувствительность на 1–2 порядка. Данная платформа дает возможность при всех прочих одинаковых компонентах повысить чувствительность анализа на токсины на 2 порядка и может быть использована как без приборов, так и с портативными ридерами для увеличения чувствительности определения токсинов. Следует отметить, что образцы подобных ридеров недавно созданы российскими компаниями. Опыт по работе в рамках данной платформы имеется во ФБУН ГНЦ ПМБ и у организаций-партнеров по разработке (Центр фундаментальных основ биотехнологии РАН).

На этих двух платформах (на основе иммунохроматографии с наномангнитными частицами с флуоресценцией, разрешенной во времени, и на основе антительного электрохимического чипа) можно в течение 3–5 лет разработать и внедрить в практику средства быстрого обнаружения и идентификации ряда как белковых, так и низкомолекулярных биотоксинов.

В качестве примера можно привести еще одну нашу разработку. На основании исследований механизма действия эффекторного (протеолитического) компонента сибиреязвенного токсина (летального фактора (ЛФ)), в ГНЦ ПМБ был разработан высокочувствительный метод детекции, позволяющий определить присутствие ЛФ в крови в концентрации <5 пг/мл. Метод базируется на способности ЛФ к эффективному расщеплению искусственного пептидного субстрата, протеолизующегося на три порядка быстрее природных субстратов. Аналогичный метод детекции может быть разработан для быстрого выявления ботулинических токсинов, однако для этого необходима идентификация высокоэффективного пептидного субстрата, расщепляемого протеолитическим компонентом ботулотоксина.

Оценивая весь массив российской и зарубежной информационной базы по выявлению токсинов и общую ситуацию с токсичной проблематикой, следует отметить, что назрела необходимость систематизировать имеющиеся сведения по данному вопросу, создать исследовательскую программу по изучению токсических компонентов, разработке средств их выявления (индикационных и идентификационных препаратов и приборов), а также стандартизованной схемы анализа проб из внешней среды, пищевых продуктов и биологических материалов на наличие данной группы молекул, вызывающих токсические состояния у людей.

С целью формирования национальной системы раннего выявления угроз биобезопасности предлагается разработать и внедрить в практику комплекс высокочувствительных средств полевой и лабораторной индикации и идентификации биотоксинов.

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



# Многоцентровое исследование по выявлению резистентности к антибактериальным препаратам стрептококка группы В в акушерских стационарах

И.Э.Григорян, Т.В.Припутневич, Н.Е.Кан, Б.О.Бембеева, А.Б.Гордеев

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

**Цель исследования:** изучить чувствительность к антибактериальным препаратам штаммов *Streptococcus agalactiae*, выделенных у беременных женщин, рожениц и новорожденных в различных регионах Российской Федерации.

**Материалы и методы.** Проведено многоцентровое исследование чувствительности к антибактериальным препаратам 598 штаммов *S. agalactiae*, выделенных у беременных женщин, рожениц и новорожденных детей. Штаммы были получены из шести городов Российской Федерации.

**Результаты.** Все полученные штаммы оказались чувствительны к бензилпенициллину, ванкомицину и линезолиду. Установлен переменный уровень резистентности к нитрофурантоину (0,7–4%). Выявлен высокий процент штаммов (96,2%), чувствительных к левофлоксацину при увеличенной экспозиции, при низком проценте резистентных штаммов (3,8%). Зафиксирован высокий уровень резистентности к эритромицину (50–53,6%) и клиндамицину (46,4–50%) в Москве, Белгороде и Екатеринбурге и в 2–2,5 раза ниже в Санкт-Петербурге и Самаре (14,7–23,2%).

**Заключение.** Полученные результаты антибиотикорезистентности *S. agalactiae* на территории Российской Федерации диктуют необходимость учета региональных особенностей при разработке алгоритмов антибиотикопрофилактики и лечения инфекций, вызванных стрептококком группы В.

**Ключевые слова:** стрептококк группы В, резистентность, антибиотикочувствительность, акушерские инфекции, неонатальные инфекции

**Для цитирования:** Григорян И.Э., Припутневич Т.В., Кан Н.Е., Бембеева Б.О., Гордеев А.Б. Многоцентровое исследование по выявлению резистентности к антибактериальным препаратам стрептококка группы В в акушерских стационарах. Бактериология. 2024; 9(1): 8–14. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-8-14

## A multicenter study to identify antibiotic resistance of group B streptococcus in obstetric hospitals

I.E.Grigrorian, T.V.Pripitnevich, N.E.Kan, B.O.Bembееva, A.B.Gordeev

V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

**Purpose of the study:** to investigate the sensitivity to antibacterial drugs of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from pregnant women, women in labour and newborns in different regions of the Russian Federation.

**Materials and methods.** A multicentre study was conducted to investigate the sensitivity to antibacterial drugs of 598 strains of *S. agalactiae* isolated from pregnant women, women in labour and newborn children. *S. agalactiae* strains were obtained from six cities of the Russian Federation.

**Results.** All strains obtained were found to be sensitive to benzylpenicillin, vancomycin and linezolid. A variable level of resistance to nitrofurantoin from 0.7% to 4% was found. A high percentage of strains (96.2%) sensitive to levofloxacin at increased exposure (I) was found, with a low percentage of resistant strains (3.8%). A high level of resistance to erythromycin (50–53.6%) and clindamycin (46.4–50%) was recorded in Moscow, Belgorod and Yekaterinburg, and 2–2.5 times lower in St. Petersburg and Samara (14.7–23.2%).

**Conclusion.** The obtained results of antibiotic resistance of *S. agalactiae* on the territory of the Russian Federation dictate the need to take into account regional peculiarities when developing algorithms of antibiotic prophylaxis and treatment of infections caused by group B streptococcus.

**Key words:** group B streptococcus, resistance, antibiotic sensitivity, obstetric infections, neonatal infections

**For citation:** Grigrorian I.E., Pripitnevich T.V., Kan N.E., Bembееva B.O., Gordeev A.B. A multicenter study to identify antibiotic resistance of group B streptococcus in obstetric hospitals. Bacteriology. 2024; 9(1): 8–14. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-8-14

### Для корреспонденции:

Григорян Ирэн Эдуардовна, младший научный сотрудник института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России  
Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4  
Статья поступила 22.08.2023, принята к печати 29.03.2024

### For correspondence:

Iren E. Grigrorian, Junior Researcher of Institute of Microbiology, Antimicrobial Therapy and Epidemiology, V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology  
Address: 4 Akademik Oparin str., Moscow, 117997, Russian Federation  
The article was received 22.08.2023, accepted for publication 29.03.2024

**С**трептококк группы В (СГВ) *Streptococcus agalactiae* является ведущим возбудителем внутриутробных инфекций и этиологическим фактором развития сепсиса, пневмонии, менингита у новорожденных [1]. *S. agalactiae* является представителем микробиоты кишечника и мочеполовой системы, и в подавляющем большинстве случаев такое носительство носит бессимптомный и/или перемежающийся характер. В 50–60% случаев новорожденные инфицируются *S. agalactiae* во время родов от матери, причем при естественных родах инфицированность от матери – носительницы СГВ максимальна и составляет >65% [2]. Заболеваемость у новорожденных, по данным различных источников, колеблется от 0,5 до 5 на 1000 новорожденных детей. Установлена зависимость инфицирования СГВ при родах от наличия инфекции или носительства, степени колонизации влагалища, а также разрыва плодных оболочек в родах [3]. Одной из часто встречающихся системных ошибок в организации профилактики СГВ-инфекций является несвоевременное назначение антибактериальных препаратов. В соответствии с международными рекомендациями внутривенное введение антибактериальных препаратов должно проводиться при интактных плодных оболочках за 4 ч до родоразрешения, чтобы обеспечить адекватную концентрацию препарата у плода [4].

При проведении адекватной антибиотикопрофилактики в родах отмечается высокая эффективность санации родовых путей с количественным снижением колонизации штаммов *S. agalactiae* в родовых путях, предотвращением колонизации кожных покровов и слизистых оболочек новорожденного и достижением уровня антибиотиков в кровотоке новорожденного выше минимальной ингибирующей концентрации, что обеспечивает элиминацию СГВ [5]. β-лактамы антибиотиков (ампициллин и цефазолин) являются препаратами выбора для предотвращения передачи СГВ от матери плоду в родах [6]. Антибиотикопрофилактика в родах ампициллином снижает СГВ-колонизацию влагалища матери и предотвращает колонизацию кожи и слизистых новорожденного ребенка в 97% случаев. [3]. Считается, что СГВ обладает высокой чувствительностью к данным антибактериальным препаратам, однако публикации последних лет указывают на важность проведения динамического мониторинга за резистентностью к пенициллину у штаммов *S. agalactiae*.

Первые данные о пенициллин-резистентных СГВ-штаммах появились еще в 1994 г. [7]. Позже, в 2008 г., отмечено снижение чувствительности к пенициллину у СГВ в США, Канаде, Корее и Японии [8–11], а наиболее выраженную резистентность отмечают исследователи в Японии, где в 2005–2006 гг. она составляла 2,3% и за 10 лет возросла до 14,7% штаммов в популяции [12, 13]. В Японии 68,9% пенициллин-резистентных штаммов *S. agalactiae* имеют резистентность к макролидам и фторхинолонам. Также отмечается, что резистентные штаммы чаще относятся к серотипу VI и сиквенс-типу ST-1 [14]. При обследовании новорожденных детей не установлено носительство пенициллин-резистентных СГВ-штаммов в рамках двух отдельных наблюдений, проводимых в Великобритании и США [15, 16]. Несмотря на это, необходимо учитывать возможный рост ко-резистентных штаммов *S. agalactiae* среди новорожденных и определить альтернативные методы профилактики и лечения.

Другим не менее важным наблюдением является выявление штаммов *S. agalactiae*, чувствительных к пенициллину, но проявляющих сниженную чувствительность к другим β-лактамам антибиотикам. Эти штаммы обозначаются как GBS-RBS (GBS with reduced beta-lactam susceptibility). В работах ученых из Японии отмечается снижение чувствительности *S. agalactiae* к цефалоспорином 3-го поколения с сохранением *in vitro* чувствительности к пенициллину [17–19].

Для пациентов с выраженной аллергической реакцией на пенициллины и цефалоспорины препаратами второго ряда для профилактики и лечения СГВ-инфекций являются клиндамицин и эритромицин [6, 20]. Чаще резистентные к эритромицину штаммы относятся к V серотипу и имеют перекрестную устойчивость к клиндамицину [21].

Среди штаммов *S. agalactiae* отмечается высокая резистентность к тетрациклам (>80%), причем в ряде случаев она сочетается с резистентностью к макролидам, линкозамидам и хлорамфениколу. До 2003 г. резистентность *S. agalactiae* к фторхинолонам не регистрировалась. В последние годы в Японии и США выделяют штаммы *S. agalactiae* с высоким уровнем резистентности к широкому спектру фторхинолонов. Обнаруженные в Японии штаммы, резистентные к фторхинолонам, относились к серотипу Ib [22, 23]. Интересна гипотеза о высокой частоте встречаемости GBS-RBS среди резистентных к фторхинолону штаммов СГВ. В исследовании G.Piccinelli et al. было показано, что из 21 штамма *S. agalactiae*, резистентных к левофлоксацину, снижение чувствительности к цефалоспорином было зарегистрировано у 13 штаммов [24].

В случаях, когда у пациентов аллергия на пенициллин и антибиотиков второго ряда оказываются неэффективны, в соответствии с протоколом антибиотикопрофилактики рекомендуется применение ванкомицина. Несмотря на то, что ванкомицин обладает высокой степенью эффективности в отношении грамположительных бактерий и является антибиотиком глубокого резерва, в мировой практике зарегистрировано всего два случая выявленной резистентности *S. agalactiae* к ванкомицину [22].

Эффективная профилактика передачи СГВ от матери с СГВ-носительством новорожденному ребенку зависит от нескольких факторов: своевременного выявления СГВ-носительства в рамках амбулаторного скрининга на 35–37-й неделях беременности, определение наличия аллергии на антибактериальные препараты и проведение динамического наблюдения за изменяющейся чувствительностью СГВ к антибактериальным препаратам.

**Цель исследования** – изучить чувствительность к антибактериальным препаратам штаммов *S. agalactiae*, выделенных у беременных женщин, рожениц и новорожденных в различных регионах Российской Федерации (РФ).

## Материалы и методы

Проведено многоцентровое исследование по изучению чувствительности к антибактериальным препаратам 598 штаммов *S. agalactiae*, выделенных из вагино-ректальных мазков беременных женщин при скрининге на 35–37-й неделях гестации, вагинального отделяемого рожениц и из кала, зева или крови новорожденных детей. Штаммы *S. agalactiae*

Таблица 1. Чувствительность штаммов *S. agalactiae* (n = 431) в Центральном ФО (Москва)  
 Table 1. Sensitivity of *S. agalactiae* strains (n = 431) in the Central Federal District (Moscow)

АНТИБИОТИК / ANTIBIOTIC	Чувствительные штаммы / Sensitive strains, % (S)	Штаммы, чувствительные при увеличенной экспозиции / Strains susceptible to increased exposure, % (I)	Резистентные штаммы / Resistant strains, % (R)
Бензилпенициллин / Benzylpenicillin	100	0	0
Ванкомицин / Vancomycin	100	0	0
Линезолид / Linezolid	100	0	0
Нитрофурантоин / Nitrofurantoin	100	0	0,7
Норфлоксацин (скрининг) / Norfloxacin (screening)	93,0	-	7,0
Левифлоксацин / Levofloxacin	-	95,6	4,4
Клиндамицин / Clindamycin	0	50,8	49,2
Эритромицин / Erythromycin	48	1,2	50,8

Таблица 2. Чувствительность штаммов *S. agalactiae* (n = 28) в Центральном ФО (Белгород)  
 Table 2. Sensitivity of *S. agalactiae* strains (n = 28) in the Central Federal District (Belgorod)

АНТИБИОТИК / ANTIBIOTIC	Чувствительные штаммы / Sensitive strains, % (S)	Штаммы, чувствительные при увеличенной экспозиции / Strains susceptible to increased exposure, % (I)	Резистентные штаммы / Resistant strains, % (R)
Бензилпенициллин / Benzylpenicillin	100	0	0
Ванкомицин / Vancomycin	100	0	0
Линезолид / Linezolid	100	0	0
Нитрофурантоин / Nitrofurantoin	100	0	0
Норфлоксацин (скрининг) / Norfloxacin (screening)	100	-	0
Левифлоксацин / Levofloxacin	-	100	0
Клиндамицин / Clindamycin	54	0	46
Эритромицин / Erythromycin	46	0	54

были получены из 6 медицинских организаций: ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России, ОГБУЗ «Белгородская областная клиническая больница Святителя Иоасафа», ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О.Отта», ФГБУ «Уральский НИИ охраны материнства и младенчества» Минздрава России, ГБУЗ «Самарская областная клиническая больница им. В.Д.Середявина», ГБУЗ «Якутская республиканская клиническая больница». Собрана коллекция различных штаммов *S. agalactiae* из пяти федеральных округов (ФО) РФ: Центральный ФО – 459 штаммов (Москва – 431 штамм, Белгород – 28 штаммов); Северо-Западный ФО (Санкт-Петербург) – 82 штамма; Уральский ФО (Екатеринбург) – 8 штаммов; Приволжский ФО (Самара) – 34 штамма и Дальневосточный ФО (Якутск) – 15 штаммов. Транспортировка штаммов *S. agalactiae* осуществлялась в замороженном виде в пробирках типа «Эппендорф» с триптиказо-соевым бульоном с глицерином и/или в криопробирках коммерческого производства с соблюдением термоцепи.

В институте микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России (Референс-центр по антимикробной резистентности в акушерстве-гинекологии и неонатологии) все штаммы были повторно идентифицированы на времяпролетном масс-спектрометре Microflex LT/SH (BrukerDaltonics, Германия). Проведено фенотипическое тестирование *S. agala-*

*ctiae* на чувствительность к бензилпенициллину, эритромицину, клиндамицину, ванкомицину, линезолиду с помощью карт AST-ST03 на автоматическом бактериологическом анализаторе Vitek 2 Compact (BioMerieux, Франция). Для выявления резистентности к нитрофурантоину и фторхинолонам были использованы диски с антибиотиками (BioRad, США). В качестве скрининга чувствительности к фторхинолонам использовали диск с норфлоксацином. Изоляты, чувствительные к норфлоксацину, расценивали как чувствительные к моксифлоксацину и как «чувствительные при увеличенной экспозиции» (I) к левифлоксацину. Для нечувствительных к норфлоксацину изолятов определяли чувствительность к левифлоксацину методом градиентной полоски (E-тест) (Liofilchem, Италия). Контроль качества постановки антибиотико-чувствительности проводили с применением контрольного штамма *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 (Microbiologics, США). Оценку полученных результатов чувствительности проводили в соответствии с рекомендациями EUCAST-2021. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью лабораторно-информационной системы Innovasystem (Россия) и программы Microsoft Excel.

## Результаты исследования

Полученные данные об уровне резистентности к антибактериальным препаратам штаммов *S. agalactiae*, выделенных

Таблица 3. Чувствительность штаммов *S. agalactiae* (n = 82) в Северо-Западном ФО (Санкт-Петербург)  
 Table 3. Sensitivity of *S. agalactiae* strains (n = 82) in the Northwestern Federal District (St. Petersburg)

АНТИБИОТИК / ANTIBIOTIC	Чувствительные штаммы / Sensitive strains, % (S)	Штаммы, чувствительные при увеличенной экспозиции / Strains susceptible to increased exposure, % (I)	Резистентные штаммы / Resistant strains, % (R)
Бензилпенициллин / Benzylpenicillin	100	0	0
Ванкомицин / Vancomycin	100	0	0
Линезолид / Linezolid	100	0	0
Нитрофурантоин / Nitrofurantoin	96	0	4
Норфлоксацин (скрининг) / Norfloxacin (screening)	98	-	2
Левифлоксацин / Levofloxacin	-	98	2
Клиндамицин / Clindamycin	83	0	17
Эритромицин / Erythromycin	66	11	23

Таблица 4. Чувствительность штаммов *S. agalactiae* (n = 8) в Уральском ФО (Екатеринбург)  
 Table 4. Sensitivity of *S. agalactiae* strains (n = 8) in the Ural Federal District (Ekaterinburg)

АНТИБИОТИК / ANTIBIOTIC	Чувствительные штаммы / Sensitive strains, % (S)	Штаммы, чувствительные при увеличенной экспозиции / Strains susceptible to increased exposure, % (I)	Резистентные штаммы / Resistant strains, % (R)
Бензилпенициллин / Benzylpenicillin	100	0	0
Ванкомицин / Vancomycin	100	0	0
Линезолид / Linezolid	100	0	0
Нитрофурантоин / Nitrofurantoin	100	0	0
Норфлоксацин (скрининг) / Norfloxacin (screening)	87	-	13
Левифлоксацин / Levofloxacin	-	87	13
Клиндамицин / Clindamycin	50	0	50
Эритромицин / Erythromycin	50	0	50

у беременных женщин, рожениц и новорожденных детей в различных регионах России представлены в табл. 1–6.

Впервые проведено многоцентровое исследование по определению уровня резистентности у штаммов *S. agalactiae*, полученных из 5 ФО и 6 городов Российской Федерации: Центрального ФО (Москва, Белгород), Северо-Западного ФО (Санкт-Петербург), Приволжского ФО (Самара), Уральского ФО (Екатеринбург) и Дальневосточного ФО (Якутск).

В результате исследования сформирована коллекция штаммов *S. agalactiae* (n = 598) с различным профилем чувствительности к антимикробным препаратам, выделенных у

пациентов, находящихся под наблюдением в медицинских организациях службы родовспоможения. При определении чувствительности к антибактериальным препаратам все полученные штаммы оказались чувствительны к бензилпенициллину, ванкомицину и линезолиду, вариабельный уровень резистентности к нитрофурантоину составил до 4%. В соответствии с рекомендациями EUCAST (2021 и 2022), штаммы к левифлоксацину оцениваются только как чувствительные при увеличенной экспозиции (I) или резистентные (рис. 1). При определении чувствительности методом скрининга с диском норфлоксацин все полученные резистентные штам-

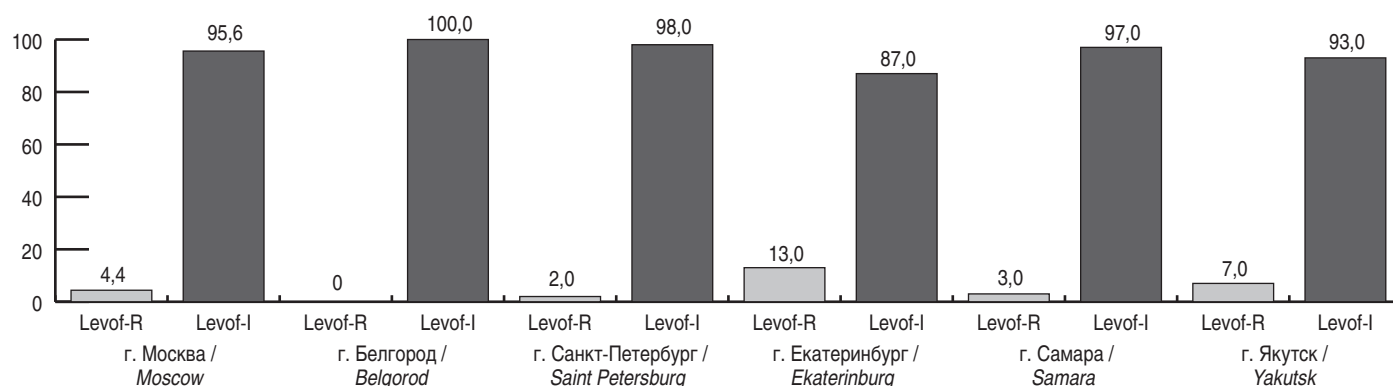


Рис. 1. Резистентные (Levof-R) и чувствительные при увеличенной экспозиции (Levof-I) к левифлоксацину штаммы *S. agalactiae* в регионах Российской Федерации. Ось ординат – % штаммов.  
 Fig. 1. Resistant (Levof-R) and sensitive with increased exposure (Levof-I) to levofloxacin strains of *S. agalactiae* in the regions of the Russian Federation. Y axis – % strains.

Таблица 5. Чувствительность штаммов *S. agalactiae* (n = 34) в Приволжском ФО (Самара)  
 Table 5. Sensitivity of *S. agalactiae* strains (n = 34) in the Volga Federal District (Samara)

АНТИБИОТИК / ANTIBIOTIC	Чувствительные штаммы / Sensitive strains, % (S)	Штаммы, чувствительные при увеличенной экспозиции / Strains susceptible to increased exposure, % (I)	Резистентные штаммы / Resistant strains, % (R)
Бензилпенициллин / Benzylpenicillin	100	0	0
Ванкомицин / Vancomycin	100	0	0
Линезолид / Linezolid	100	0	0
Нитрофурантоин / Nitrofurantoin	100	0	0
Норфлоксацин (скрининг) / Norfloxacin (screening)	97	-	3
Левифлоксацин / Levofloxacin	-	97	3
Клиндамицин / Clindamycin	85	0	15
Эритромицин / Erythromycin	73	9	18

Таблица 6. Количество (%) чувствительных, чувствительных при увеличенной экспозиции и резистентных штаммов *S. agalactiae* (n = 15) в Дальневосточном ФО (Якутск)  
 Table 6. Number (%) of sensitive, sensitive with increased exposure and resistant strains of *S. agalactiae* (n = 15) in the Far Eastern Federal District (Yakutsk)

АНТИБИОТИК / ANTIBIOTIC	Чувствительные штаммы / Sensitive strains, % (S)	Штаммы, чувствительные при увеличенной экспозиции / Strains susceptible to increased exposure, % (I)	Резистентные штаммы / Resistant strains, % (R)
Бензилпенициллин / Benzylpenicillin	100	0	0
Ванкомицин / Vancomycin	100	0	0
Линезолид / Linezolid	100	0	0
Нитрофурантоин / Nitrofurantoin	100	0	0
Норфлоксацин (скрининг) / Norfloxacin (screening)	80	-	20
Левифлоксацин / Levofloxacin	-	93	7
Клиндамицин / Clindamycin	53	0	47
Эритромицин / Erythromycin	80	13	7

мы были исследованы на чувствительность к левифлоксацину с помощью определения минимальной подавляющей концентрации Е-тестами. Резистентными к левифлоксацину оказались 23 штамма стрептококка, что составило 3,8% от общего числа штаммов коллекции. Минимальная подавляющая концентрация для резистентных штаммов составила  $\geq 32$  мг/л. Чувствительными при увеличенной экспозиции (I) были 96,2% штаммов.

Особую настороженность в последнее время вызывают штаммы *S. agalactiae*, резистентные к эритромицину и клиндамицину. На рис. 2 представлены полученные нами резуль-

таты по определению уровня резистентности к клиндамицину (от 15 до 50%) и эритромицину (от 7 до 54%) среди *S. agalactiae*, выделенных в различных регионах РФ.

В рамках проведенного исследования не выявлены штаммы *S. agalactiae*, резистентные к бензилпенициллину, ванкомицину и линезолиду. Отмечен низкий уровень резистентности к нитрофурантоину (0–4%), что является значимым результатом для того, чтобы рассмотреть данный антибактериальный препарат для применения в лечении осложненных инфекций мочевыводящих путей, учитывая наличие отечественного производства и доступности данного препарата в РФ.

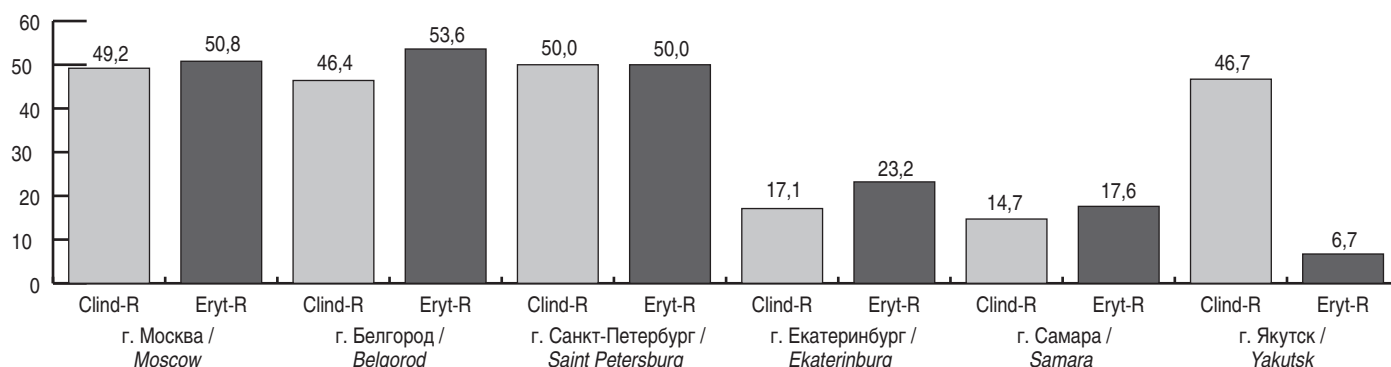


Рис. 2. Штаммы *S. agalactiae*, резистентные к клиндамицину (Clind-R) и эритромицину (Eryt-R), по регионам Российской Федерации.  
 Fig. 2. *S. agalactiae* strains resistant to clindamycin (Clind-R) and erythromycin (Eryt-R) by region of the Russian Federation

Особую важность имеют полученные данные по резистентности *S. agalactiae* к макролидам и линкозамидам. В нашем исследовании мы зафиксировали высокий уровень резистентности к эритромицину (50–53,6%) и клиндамицину (46,4–50%) у полученных штаммов в Московском регионе, Белгороде и Екатеринбурге, при этом в Санкт-Петербурге и Самаре уровень резистентности был ниже в 2–2,5 раза (14,7–23,2%). Вызывают интерес полученные данные по Дальневосточному ФО, где резистентность СГВ к клиндамицину составила 46,7%, а к эритромицину – всего 6,7%, что значительно отличается от данных по остальным регионам, включенным в исследование.

Во всем мире исследователи отмечают повышение уровня резистентности СГВ к эритромицину. Наиболее высокие показатели отмечаются в Китае, где уровень резистентности к эритромицину достигает 74,1% [25, 26]. В США этот показатель составляет 54,8%, в Италии – 43,75%, в Ирландии – 22,5% [27–29]. Большой интерес представляет крупное исследование, проведенное во Франции, которое выявило снижение уровня резистентности к макролидам с 47 до 30% в период с 2007 по 2014 г. [30]. Возможной причиной этих изменений авторы публикации считают изменение схем антибиотикопрофилактики в родах и временное исключение макролидов из списка рекомендуемых лекарственных средств в связи с высоким уровнем резистентности. Самые низкие показатели зарегистрированы в других странах, таких как Гана (1%), Литва (4,1%) и Исландия (9%) [22].

Устойчивость к клиндамицину среди штаммов СГВ также неуклонно растет. Исследователи отмечают высокий уровень резистентности в таких странах, как Португалия (34%), Алжир (43,2%) и Тайвань (65,9%) [31–33].

### Заключение

В нашем исследовании была проведена оценка чувствительности к антимикробным препаратам штаммов *S. agalactiae*, полученных из разных городов на территории РФ. Результаты работы представляют важную эпидемиологическую информацию, которая поможет в профилактике и своевременном и рациональном назначении лечения антибактериальными препаратами, учитывая ведущую роль *S. agalactiae* в развитии акушерских и неонатальных заболеваний. Проведение многоцентрового анализа резистентности СГВ важно для разработки алгоритмов антибиотикопрофилактики и лечения с учетом региональных особенностей распространения резистентных штаммов и определения необходимости альтернативных способов профилактики передачи данного микроорганизма от матери плоду с целью снижения числа неонатальных инфекций, смертности, инвалидизации и улучшения демографических показателей.

### Информация о финансировании

Исследование выполнено в рамках Государственного задания на выполнение научно-исследовательской работы по теме «Изучение механизмов возникновения резистентности у клинически значимых микроорганизмов к антимикробным препаратам с формированием коллекции штаммов микроорганизмов и разработкой тест-системы, содержащей молекулярные маркеры новых механизмов резистентности ус-

ловно-патогенных микроорганизмов» (№056-00099-21-07 от 08.10.2021).

### Financial support

The study was carried out within the framework of the State assignment to carry out research work on the topic: “Studying the mechanisms of resistance in clinically significant microorganisms to antimicrobial drugs with the formation of a collection of strains of microorganisms and the development of a test system containing molecular markers of new mechanisms of resistance of opportunistic microorganisms” (No 056-00099-21-07 dated 10/08/2021).

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

### Литература / References

1. Melin P, Efstratiou A. Group B streptococcal epidemiology and vaccine needs in developed countries. *Vaccine*. 2013 Aug 28;31 Suppl 4:D31-42. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.05.012
2. Russell NJ, Seale AC, O'Driscoll M, O'Sullivan C, Bianchi-Jassir F, Gonzalez-Guarin J, et al.; GBS Maternal Colonization Investigator Group. Maternal Colonization With Group B Streptococcus and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin Infect Dis*. 2017 Nov 6;65(suppl\_2):S100-S111. DOI: 10.1093/cid/cix658
3. Prevention of Group B Streptococcal Early-Onset Disease in Newborns: ACOG Committee Opinion, Number 782. *Obstet Gynecol*. 2019 Jul;134(1):1. DOI: 10.1097/AOG.0000000000003334
4. Verani JR, McGee L, Schrag SJ; Division of Bacterial Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention of perinatal group B streptococcal disease – revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep*. 2010 Nov 19;59(RR-10):1-36.
5. Koucky M, Kamel R, Vistejnova L, Kalis V, Ismail KM. A global perspective on management of bacterial infections in pregnancy: a systematic review of international guidelines. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2022 Oct;35(19):3751-3760. DOI: 10.1080/14767058.2020.1839879
6. Клинические рекомендации «Роды одноплодные, самопроизвольное родоразрешение в затылочном предлежании (нормальные роды)», 2021. / *Klinicheskie rekomendatsii «Rody odnoplodnye, samoproizvol'noe rodorazreshenie v zatylochnom predlezhanii (normal'nye rody)»*, 2021. (In Russian).
7. Betriu C, Gomez M, Sanchez A, Cruceyra A, Romero J, Picazo JJ. Antibiotic resistance and penicillin tolerance in clinical isolates of group B streptococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994 Sep;38(9):2183-6. DOI: 10.1128/AAC.38.9.2183
8. Metcalf BJ, Chochua S, Gertz RE Jr, Hawkins PA, Ricaldi J, Li Z, et al; Active Bacterial Core surveillance team. Short-read whole genome sequencing for determination of antimicrobial resistance mechanisms and capsular serotypes of current invasive *Streptococcus agalactiae* recovered in the USA. *Clin Microbiol Infect*. 2017 Aug;23(8):574.e7-574.e14. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.02.021
9. Longtin J, Vermeiren C, Shahinas D, Tamber GS, McGeer A, Low DE, et al. Novel mutations in a patient isolate of *Streptococcus agalactiae* with reduced penicillin susceptibility emerging after long-term oral suppressive therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jun;55(6):2983-5. DOI: 10.1128/AAC.01243-10
10. Morozumi M, Wajima T, Takata M, Iwata S, Ubukata K. Molecular Characteristics of Group B Streptococci Isolated from Adults with Invasive Infections in Japan. *J Clin Microbiol*. 2016 Nov;54(11):2695-2700. DOI: 10.1128/JCM.01183-16
11. Yi A, Kim CK, Kimura K, Arakawa Y, Hur M, Yun YM, et al. First Case in Korea of Group B Streptococcus With Reduced Penicillin Susceptibility Harboring Amino

- Acid Substitutions in Penicillin-Binding Protein 2X. *Ann Lab Med.* 2019 Jul;39(4):414-416. DOI: 10.3343/alm.2019.39.4.414
12. Dahesh S, Hensler ME, Van Sorge NM, Gertz RE Jr, Schrag S, Nizet V, Beall BW. Point mutation in the group B streptococcal *pbp2x* gene conferring decreased susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Aug;52(8):2915-8. DOI: 10.1128/AAC.00461-08
13. Seki T, Kimura K, Reid ME, Miyazaki A, Banno H, Jin W, Wachino J, Yamada K, Arakawa Y. High isolation rate of MDR group B streptococci with reduced penicillin susceptibility in Japan. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Oct;70(10):2725-8. DOI: 10.1093/jac/dkv203
14. Kimura K, Nagano N, Nagano Y, Wachino J, Suzuki S, Shibayama K, Arakawa Y. Predominance of sequence type 1 group with serotype VI among group B streptococci with reduced penicillin susceptibility identified in Japan. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Nov;66(11):2460-4. DOI: 10.1093/jac/dkr352
15. O'Sullivan CP, Lamagni T, Patel D, Efstratiou A, Cunney R, Meehan M, et al. Group B streptococcal disease in UK and Irish infants younger than 90 days, 2014–2015: a prospective surveillance study. *Lancet Infect Dis.* 2019 Jan;19(1):83-90. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30555-3
16. Nanduri SA, Petit S, Smelser C, Apostol M, Alden NB, Harrison LH, et al. Epidemiology of Invasive Early-Onset and Late-Onset Group B Streptococcal Disease in the United States, 2006 to 2015: Multistate Laboratory and Population-Based Surveillance. *JAMA Pediatr.* 2019 Mar 1;173(3):224-233. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2018.4826
17. Nagano N, Nagano Y, Toyama M, Kimura K, Shibayama K, Arakawa Y. Penicillin-susceptible group B streptococcal clinical isolates with reduced cephalosporin susceptibility. *J Clin Microbiol.* 2014 Sep;52(9):3406-10. DOI: 10.1128/JCM.01291-14
18. Banno H, Kimura K, Seki T, Jin W, Wachino J, Yamada K, et al. High isolation rate and multidrug resistance tendency of penicillin-susceptible group B Streptococcus with reduced ceftibuten susceptibility in Japan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018 Aug;37(8):1511-1519. DOI: 10.1007/s10096-018-3278-7
19. Murayama SY, Seki C, Sakata H, Sunaoshi K, Nakayama E, Iwata S, et al.; Invasive Streptococcal Disease Working Group. Capsular type and antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* isolates from patients, ranging from newborns to the elderly, with invasive infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Jun;53(6):2650-3. DOI: 10.1128/AAC.01716-08
20. Prevention of Group B Streptococcal Early-Onset Disease in Newborns: ACOG Committee Opinion, Number 782. *Obstet Gynecol.* 2019 Jul;134(1):1. DOI: 10.1097/AOG.0000000000003334
21. Campelo FA, Pedrosa AC, Antúnez IÁ, Capuz BL. Phenotypes and mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides in *Streptococcus agalactiae* isolates with clinical significance in an eight-year period (2002–2010). *Rev Esp Quimioter.* 2012 Mar;25(1):42-6. (In Spanish).
22. Hayes K, O'Halloran F, Cotter L. A review of antibiotic resistance in Group B Streptococcus: the story so far. *Crit Rev Microbiol.* 2020 May;46(3):253-269. DOI: 10.1080/1040841X.2020.1758626
23. Park C, Nichols M, Schrag SJ. Two cases of invasive vancomycin-resistant group B streptococcus infection. *N Engl J Med.* 2014 Feb 27;370(9):885-6. DOI: 10.1056/NEJMc1308504
24. Piccinelli G, Carlentini G, Gargiulo F, Caruso A, De Francesco MA. Analysis of Point Mutations in the *pbp2x*, *pbp2b*, and *pbp1a* Genes of *Streptococcus agalactiae* and Their Relation with a Reduced Susceptibility to Cephalosporins. *Microb Drug Resist.* 2017 Dec;23(8):1019-1024. DOI: 10.1089/mdr.2017.0013
25. Wang P, Tong JJ, Ma XH, Song FL, Fan L, Guo CM, et al. Serotypes, antibiotic susceptibilities, and multi-locus sequence type profiles of *Streptococcus agalactiae* isolates circulating in Beijing, China. *PLoS One.* 2015 Mar 17;10(3):e0120035. DOI: 10.1371/journal.pone.0120035
26. Lu B, Chen X, Wang J, Wang D, Zeng J, Li Y, et al. Molecular characteristics and antimicrobial resistance in invasive and noninvasive Group B Streptococcus between 2008 and 2015 in China. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016 Dec;86(4):351-357. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.08.023
27. Francois Watkins LK, McGee L, Schrag SJ, Beall B, Jain JH, Pondo T, et al. Epidemiology of Invasive Group B Streptococcal Infections Among Nonpregnant Adults in the United States, 2008–2016. *JAMA Intern Med.* 2019 Apr 1;179(4):479-488. DOI: 10.1001/jamainternmed.2018.7269
28. Matani C, Trezzi M, Matteini A, Catalani C, Messeri D, Catalani C. *Streptococcus agalactiae*: prevalence of antimicrobial resistance in vaginal and rectal swabs in Italian pregnant women. *Infez Med.* 2016 Sep 1;24(3):217-21.
29. Hayes K, Cotter L, Barry L, O'Halloran F. Emergence of the L phenotype in Group B Streptococci in the South of Ireland. *Epidemiol Infect.* 2017 Dec;145(16):3535-3542. DOI: 10.1017/S0950268817002461
30. Hays C, Louis M, Plainvert C, Dmytruk N, Touak G, Trieu-Cuot P, Poyart C, Tazi A. Changing Epidemiology of Group B Streptococcus Susceptibility to Fluoroquinolones and Aminoglycosides in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Nov 21;60(12):7424-7430. DOI: 10.1128/AAC.01374-16
31. Kao Y, Tsai MH, Lai MY, Chu SM, Huang HR, Chiang MC, Fu RH, Lu JJ, Hsu JF. Emerging serotype III sequence type 17 group B streptococcus invasive infection in infants: the clinical characteristics and impacts on outcomes. *BMC Infect Dis.* 2019 Jun 19;19(1):538. DOI: 10.1186/s12879-019-4177-y
32. Lopes E, Fernandes T, Machado MP, Carriço JA, Melo-Cristino J, Ramirez M, et al; Portuguese Group for the Study of Streptococcal Infections. Increasing macrolide resistance among *Streptococcus agalactiae* causing invasive disease in non-pregnant adults was driven by a single capsular-transformed lineage, Portugal, 2009 to 2015. *Euro Surveill.* 2018 May;23(21):1700473. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.21.1700473
33. Bergal A, Loucif L, Benouareth DE, Bentorki AA, Abat C, Rolain JM. Molecular epidemiology and distribution of serotypes, genotypes, and antibiotic resistance genes of *Streptococcus agalactiae* clinical isolates from Guelma, Algeria and Marseille, France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015 Dec;34(12):2339-48. DOI: 10.1007/s10096-015-2487-6

#### Информация о соавторах:

Припутневич Татьяна Валерьевна, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, доцент, директор Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России

Кан Наталья Енкиновна, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной работе, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России

Бембеева Байр Очировна, врач бактериолог Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России

Гордеев Алексей Борисович, кандидат медицинских наук, руководитель отдела молекулярной микробиологии и биоинформатики Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России

#### Information about co-authors:

Tatiana V. Priputnevich, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, MD, PhD, DSc, docent, Director of the Institute of Microbiology, Antimicrobial Therapy and Epidemiology of V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology

Natalia E. Kan, MD, PhD, DSc, professor, Deputy Director for Science of V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology

Bayr O. Bembeeva, bacteriologist of Institute of Microbiology, Antimicrobial Therapy and Epidemiology, V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology

Alexey B. Gordeev, PhD, MD, Head of the Department of Molecular Microbiology and Bioinformatics of Institute of Microbiology, Antimicrobial Therapy and Epidemiology, V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology

# Оценка генотоксичности почв, загрязненных несимметричным диметилгидразином (гептилом) и авиационным керосином

Г.А.Жариков<sup>1</sup>, А.И.Марченко<sup>1</sup>, М.Г.Жариков<sup>1</sup>, Л.В.Коломбет<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России, филиал «НИЦ токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов», Московская область, Серпуховский городской округ, п. Большевик, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk, Российская Федерация

Загрязнение окружающей среды токсичными химическими веществами оказывает негативное влияние на здоровье населения и окружающую среду. Использование в авиационной и ракетно-космической деятельности высокотоксичных топлив неизбежно приводит к загрязнению территорий аэропортов и космодромов. Если их токсическое влияние, как правило, достаточно очевидно, то скрытое генотоксическое воздействие определить трудно.

**Цель исследований:** оценить генотоксичность проб почвы, отобранных возле аэропортов и космодрома.

Исследованы пробы почвы с территорий возле аэропортов АО «Домодедово» и АО «Шереметьево» (г. Москва), космодрома «Байконур» (Казахстан). Генотоксичность почв изучали в тесте Эймса с использованием бактерий штаммов *Salmonella Typhimurium* TA 98 и TA 100 и методом хромосомных aberrаций фаз деления в клетках корней лука репчатого *Allium cepa*. Результаты исследований показали, что генотоксичность территорий аэропортов, загрязненных авиационным керосином, соответствует слабой и безопасна для пассажиров и обслуживающего персонала. Генотоксичность почвы, загрязненной гептилом, с места аварии на космодроме «Байконур» соответствует средней степени и представляет опасность для обслуживающего персонала.

**Ключевые слова:** генотоксичность, компоненты ракетных топлив, диметилгидразин (гептил), авиационный керосин, тест Эймса, метод хромосомных aberrаций

**Для цитирования:** Жариков Г.А., Марченко А.И., Жариков М.Г., Коломбет Л.В. Оценка генотоксичности почв, загрязненных несимметричным диметилгидразином (гептилом) и авиационным керосином. Бактериология. 2024; 9(1): 15–21. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-21-21

## Evaluation of the genotoxicity of soils polluted with asymmetric dimethylhydrazine (heptil) and aviation kerosene

G.A.Zharikov<sup>1</sup>, A.I.Marchenko<sup>1</sup>, M.G.Zharikov<sup>1</sup>, L.V.Kolombet<sup>2</sup>

<sup>1</sup>NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Branch – RC Toxicology and Hygienic Regulation of Biopreparations, Moscow region, Serpukhov city district, Russian Federation;

<sup>2</sup>State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Pollution of the environment with toxic chemicals has a negative impact on the health of the population and environment. The use of highly toxic fuels in aviation and rocket and space activities inevitably leads to pollution of the territories of airports and spaceports. While their toxic effect is usually quite obvious, the latent genotoxic effect is difficult to determine.

**The purpose of the research:** to evaluate the genotoxicity of soil samples taken near airports and the cosmodrome.

Soil samples were examined from areas near the airports of Domodedovo JSC and Sheremetyevo JSC (Moscow), and the Baikonur Cosmodrome (Kazakhstan). The genotoxicity of soils was studied in the Ames test using bacteria strains *Salmonella Typhimurium* TA98 and TA100 and also by the method of chromosomal aberrations of division phases in the cells of onion *Allium cepa* roots. The research results showed that the genotoxicity of airport areas contaminated with aviation kerosene is weak and safe for passengers and staff. The research results showed that the genotoxicity of airport areas contaminated with

### Для корреспонденции:

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

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

Телефон: (4967) 70-5238

E-mail: Zharikov@toxicbio.ru

Статья поступила 15.09.2023, принята к печати 29.03.2024

### 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., Bolshevik, Serpukhov city district, Moscow region, 142253, Russian Federation

Phone: (4967) 70-5238

E-mail: Zharikov@toxicbio.ru

The article was received 15.09.2023, accepted for publication 29.03.2024



aviation kerosene is weak and safe for passengers and staff. The genotoxicity of soil contaminated with heptil from the accident site at the Baikonur cosmodrome is moderate and poses a danger to operating personnel.

**Key words:** genotoxicity, propellant components, dimethylhydrazine (heptyl), aviation kerosene, Ames test, chromosome aberration method

**For citation:** Zharikov G.A., Marchenko A.I., Zharikov M.G., Kolombet L.V. Evaluation of the genotoxicity of soils polluted with asymmetric dimethylhydrazine (heptil) and aviation kerosene. Бактериология. 2024; 9(1): 15–21. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-15-21

**О**громное количество химических веществ, используемых в сельском хозяйстве, 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 и человека [2].

Проведение мониторинга промышленных территорий позволяет оценить степень воздействия деятельности человека на окружающую среду и прогнозировать ее способность к самовосстановлению [3]. С учетом степени загрязнения почв разрабатывают перечень мероприятий по их очистке, чтобы предотвратить заболевания у людей, работающих или проживающих на этой территории. Традиционно для токсикологической оценки территорий применяют химико-аналитические методы. 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 является их высокая

**Таблица 1. Мутагенная активность химических веществ в тесте Эймса**

*Table 1. Mutagenic activity of chemicals in the Ames test*

Кратность превышения среднего числа колоний ревертантов в данной опытной пробе над контролем /  
The excess of the average number of revertant colonies in a given experimental sample over the control

Штамм TA98 / Strain TA98	≤2,0	2,0–10	10–100	≥100
Штамм TA100 / Strain TA100	≤1,8	1,8–10	10–100	≥100
Мутагенная активность / Mutagenic activity	Не выявлена / Not identified	Слабая / Weak	Средняя / Weak	Сильная / Strong

**Таблица 2. Генотоксичность почвы с территории космодрома «Байконур» по штаммам S. Typhimurium в тесте Эймса**

*Table 2. Genotoxicity of soil from the territory of the Baikonur cosmodrome according to S. Typhimurium strains in the Ames test*

Водная вытяжка почвы, разведение воды / Water extraction of soil, water dilution	Количество ревертантных колоний индикаторных штаммов / Number of revertant colonies of indicator strains, M ± σ*	Количество ревертантных колоний индикаторных штаммов / Number of revertant colonies of indicator strains, M ± Σ	Кратность превышения среднего числа колоний ревертантов в данной опытной пробе под контролем / Multiplicity of excess of the average number of revertant colonies in a given experimental sample under control			
			-S	+S	-S	+S
<b>Штамм S. Typhimurium TA98 / Strain S. Typhimurium TA98</b>						
Отрицательный контроль / Negative control	16,0 ± 1,0	18,0 ± 3,0	-	-	-	-
Исходная (1) / Original (1)	336,3 ± 11,9	324,0 ± 7,9	21,0	Средняя / Middle	18,0	Средняя / Middle
1:10	288,0 ± 10,1	288,0 ± 13,2	18,0	Средняя / Middle	16,0	Средняя / Middle
1:100	208,0 ± 10,5	198,0 ± 5,3	13,0	Средняя / Middle	11,0	Средняя / Middle
Положительный контроль / Positive control	384,0 ± 3,0	414,0 ± 5,6	24	Средняя / Middle	23,0	Средняя / Middle
<b>Штамм S. Typhimurium TA100 / Strain S. Typhimurium TA100</b>						
Отрицательный контроль / Negative control	19,0 ± 1,0	21,0 ± 2,0	-	-	-	-
Исходная (1) / Original (1)	168,0 ± 13,2	161,7 ± 3,5	8,8	Слабая / Weak	7,7	Слабая / Weak
1:10	68,3 ± 4,0	65,3 ± 3,2	3,6	Слабая / Weak	3,1	Слабая / Weak
1:100	43,7 ± 1,5	40,0 ± 2,6	2,3	Слабая / Weak	1,9	Слабая / Weak
Положительный контроль / Positive control	228,0 ± 2,0	223,0 ± 6,1	12,0	Средняя / Middle	10,6	Средняя / Middle

\*среднее из 3 чашек / average of 3 cups.

Таблица 3. Генотоксичность почвы аэропорта АО «Домодедово» по штаммам *S. Typhimurium* в тесте Эймса  
 Table 3. Genotoxicity of soil at the Domodedovo JSC airport by *S. Typhimurium* strains in the Ames test

Водная вытяжка почвы, разведение воды / Water extraction of soil, water dilution	Количество ревертантных колоний индикаторных штаммов / Number of revertant colonies of indicator strains, $M \pm \Sigma^*$	Количество ревертантных колоний индикаторных штаммов / Number of revertant colonies of indicator strains, $M \pm \Sigma$	Кратность превышения среднего числа колоний ревертантов в данной опытной пробе под контролем / Multiplicity of excess of the average number of revertant colonies in a given experimental sample under control			
			-S	+S	-S	+S
Штамм <i>S. Typhimurium</i> TA98 / Strain <i>S. Typhimurium</i> TA98						
Отрицательный контроль / Negative control	19,0 ± 1,0	21,0 ± 2,0	-	-	-	-
Исходная (1) / Original (1)	168,0 ± 13,2	161,7 ± 3,5	8,8	Слабая / Weak	7,7	Слабая / Weak
1:10	68,3 ± 4,0	65,3 ± 3,2	3,6	Слабая / Weak	3,1	Слабая / Weak
1:100	43,7 ± 1,5	40,0 ± 2,6	2,3	Слабая / Weak	1,9	Слабая / Weak
Положительный контроль / Positive control	228,0 ± 2,0	223,0 ± 6,1	12,0	Средняя / Middle	10,6	Средняя / Middle
Штамм <i>S. Typhimurium</i> TA100 / Strain <i>S. Typhimurium</i> TA100						
Отрицательный контроль / Negative control	41,0 ± 2,6	44,0 ± 2,0	-	-	-	-
Исходная (1) / Original (1)	299,3 ± 2,5	293,0 ± 9,2	7,3	Слабая / Weak	6,7	Слабая / Weak
1:10	135,3 ± 3,1	132,0 ± 8,0	3,3	Слабая / Weak	3,0	Слабая / Weak
1:100	42,0 ± 3,6	66,0 ± 1,0	1,0	Не выявлена / Not identified	1,5	Не выявлена / Not identified
Положительный контроль / Positive control	452,3 ± 7,6	470,7 ± 3,8	11,0	Средняя / Middle	10,7	Средняя / Middle

трудоемкость, необходимость приобретения высокоточного, дорогостоящего аналитического оборудования. Следует также помнить: для многих химических веществ не разработаны гигиенические нормативы в почве, что зачастую не позволяет судить об их токсичности и генотоксичности, прогнозировать воздействие на человека [4–8]. Применение биотестирования для оценки токсичности почв на территориях аэропортов и космодромов позволят выявить возможные токсические эффекты на обслуживающий персонал и пассажиров.

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

**Цель исследований:** оценить генотоксичность проб почвы, отобранных возле аэропортов и космодрома.

### Материалы и методы

Отбор проб почвы проводили ежеквартально на территории аэропортов АО «Домодедово» (около стоек 1 и 5 у

взлетной полосы; на берегу реки Гнилуша в дер. Кутузово; южнее аэропорта у водоема Журавлиная заводь), АО «Шереметьево» (возле водовыпуска Южный в Воскресенский ручей). Пробы почвы брали лопаткой из верхнего слоя (0–10 см). Почву, загрязненную ракетным топливом гептилом, отбирали на месте падения ракеты-носителя «Протон-М», платформа 81, космодром «Байконур» (Казахстан). Также готовили модельную почву (дерново-подзолистого типа), с внесением гептила в концентрации 1000 мг/кг, на ФКП «НИЦ РКП», г. Пересвет Московской области.

Тест Эймса основан на изучении генных мутаций с использованием бактерий штаммов *Salmonella Typhimurium* TA98 и TA100, ауксотрофных по гистидину с (+S9) и без (-S9) метаболической активации. Для исследований готовили нативную водную вытяжку почвы и ее разведения (1:10; 1:100) согласно методике. В качестве отрицательного контроля использовали дистиллированную воду с диметилсульфоксидом (2%). Степень генотоксичности на генном уровне в тестах на штаммах *S. Typhimurium* TA98 и TA100 определяли кратностью превышения числа ревертантов в опытном варианте над контролем [9], табл. 1.

Метод хромосомных aberrаций основан на изучении разных фаз деления в клетках корней лука репчатого (*Allium cepa*) [10–12]. Для исследований готовили водные вытяжки почвы. На каждую пробу почвы было взято по 5 луковиц. Их проращивали в течение 96 ч с последующим обрезанием и

Таблица 4. Генотоксичность почвы аэропорта АО «Шереметьево» по штаммам *S. Typhimurium* в тесте Эймса  
 Table 4. Genotoxicity of soil at the Sheremetyevo JSC airport by *S. Typhimurium* strains in the Ames test

Водная вытяжка почвы, разведение воды / Water extraction of soil, water dilution	Количество ревертантных колоний индикаторных штаммов / Number of revertant colonies of indicator strains, $M \pm \Sigma^*$	Количество ревертантных колоний индикаторных штаммов / Number of revertant colonies of indicator strains, $M \pm \Sigma$	Кратность превышения среднего числа колоний ревертантов в данной опытной пробе под контролем / Multiplicity of excess of the average number of revertant colonies in a given experimental sample under control			
			-S	+S	-S	+S
Штамм <i>S. Typhimurium</i> TA100 / Strain <i>S. Typhimurium</i> TA98						
Отрицательный контроль / Negative control	19,0 ± 1,0	22,0 ± 1,0	-	-	-	-
Исходная (1) / Original (1)	148,3 ± 10,0	158,7 ± 7,8	7,8	Слабая / Weak	7,2	Средняя / Middle
1:10	100,7 ± 1,5	99,0 ± 3,0	5,3	Слабая / Weak	4,5	Слабая / Weak
1:100	68,7 ± 3,5	72,0 ± 3,6	3,6	Слабая / Weak	3,3	Слабая / Weak
Положительный контроль / Positive control	226,3 ± 7,1	237,7 ± 5,9	11,9	Средняя / Middle	10,8	Средняя / Middle
Штамм <i>S. Typhimurium</i> TA98 / Strain <i>S. Typhimurium</i> TA100						
Отрицательный контроль / Negative control	43,0 ± 3,0	45,0 ± 3,6	-	-	-	-
Исходная (1) / Original (1)	389,3 ± 2,1	383,0 ± 2,6	9,5	Слабая / Weak	8,7	Слабая / Weak
1:10	378,7 ± 7,1	351,3 ± 4,2	8,8	Слабая / Weak	7,8	Слабая / Weak
1:100	180,3 ± 4,7	166,7 ± 6,1	4,2	Слабая / Weak	3,7	Слабая / Weak
Положительный контроль / Positive control	490,3 ± 4,0	540,0 ± 7,5	11,4	Средняя / Middle	12,0	Средняя / Middle

фиксацией корней в уксусном спирте (96%-й спирт + ледяная уксусная кислота в пропорциях 3:1). Для каждой концентрации брали по 5 корней, окрашивали ацетоорсеином и приготавливали по 5 давленных препаратов кончиков корней (с зоной роста) длиной 2–3 мм. Препараты корневых меристем просматривали под микроскопом при увеличении 12,5 × 1,5 × 40, подсчитывали клетки с отметкой фаз и хромосомных aberrаций. Митотический индекс рассчитывали как отношение количества всех делящихся клеток к общему количеству подсчитанных клеток в препарате, выраженное в процентах.

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 и обсуждение

Проведен предварительный химический анализ и биотестирование проб почвы, отобранных на территориях аэропортов «Домодедово» и «Шереметьево», с места аварии на космодроме «Байконур». Загрязнение почвы на территории аэропорта «Домодедово» в течение года составляет по этиленгликолю от 0,1 до 1,3 мг/кг, по авиационному керосину – 0,6–2,8 г/кг. Загрязнение почвы на территории аэропорта «Шереметьево» в течение года составляет по этиленглико-

лю от 0,1 до 0,12 мг/кг, по нефтепродуктам – 1,2–1,4 г/кг. Превышение допустимых концентраций гептила в пробах почвы с космодрома «Байконур» составило 64 раза.

Результаты биотестирования на дафниях, рыбах гуппи, дождевых червях, хлорелле на приборе «Биотокс-10М» с люминесцирующими микроорганизмами показали острую и хроническую токсичность отобранных почвенных проб и хорошо коррелируют с концентрациями КРТ, выявляемыми химическим анализом. Материалы исследований были представлены ранее [13].

### А. Генотоксичность почвы с территории космодрома в тесте Эймса

Результаты исследования генотоксичности почвы с территории космодрома «Байконур» в тесте Эймса представлены в табл. 2. Из этих данных следует, что генотоксичность почвы для штаммов *S. Typhimurium* TA98 и TA100 соответствует средней степени (см. табл. 1). Кратность превышения среднего числа колоний ревертантов в почве по сравнению с контролем составила 18,0–21,0, а для штамма *S. Typhimurium* TA100 – 15,0–17,0 (табл. 2).

Генотоксичность модельной почвы, загрязненной гептилом 1000 мг/кг, по результатам теста Эймса на штаммах *S. Typhimurium* TA98 и TA100 соответствует средней степени. Кратность превышения среднего числа колоний ревертантов в почве по сравнению с контролем составила 7,3–11,1, а по штамму *S. Typhimurium* TA100 – 8,6–11,2.

Таблица 5. Митотический и фазный индексы в пробах почвы из космодрома и аэропортов  
 Table 5. Mitotic and phase indices in soil samples from the cosmodrome and airports

Проба / Sample	Число наблюдаемых клеток / Number of observed cells	Число делящихся клеток / Number of dividing cells	Митотический индекс / Mitotic index (%)	Профаза / Prophase (%)	Метафаза / Metaphase (%)	Анафаза / Anaphase (%)	Телофаза / Telophase (%)
Контроль (дистиллированная вода) / Control (distilled water)	5224	633	12,12	47,39	13,27	21,80	17,54
Почва с космодрома «Байконур» / Soil from the Baikonur Cosmodrome	5032	254	7,05	41,35	15,25	24,15	19,25
Модельная почва с гептилом / Model soil with heptyl	5078	288	5,67	38,91	16,30	23,60	21,17
Почва из аэропорта «Шереметьево» / Soil from Sheremetyevo airport	5212	524	10,05	36,13	14,06	22,85	26,95
Почва из аэропорта «Домодедово» / Soil from Domodedovo airport	5246	530	10,10	36,05	14,15	22,86	26,94

Таблица 6. Хромосомные aberrации в пробах почвы из космодрома и аэропортов  
 Table 6. Chromosomal aberrations in soil samples from the cosmodrome and airports

Проба / Sample	Хромосомные aberrации / Chromosomal aberrations										Клетки с aberrациями / Cells with aberrations, %				
	Профаза / Prophase	Метафаза / Metaphase	Анафаза / Anaphase	Телофаза / Telophase	Число делящихся клеток / Number of observed cells	Микродрга / Micronuclei	C-метафаза / C-metaphase	Липкая метафаза / Sticky metaphase	Анафаза с хромосомными мостиками / Anaphase with chromosome bridges	Мост и два фрагмента в анафазе / Bridge and two fragments in anaphase		Отстающая хромосома в анафазе / Lagging chromosome in anaphase	Телофаза с хромосомными мостиками / Telophase with chromosome bridges	Телофаза с потерей хромосом / Telophase with chromosome loss	Телофаза с микродргом / Telophase with micronucleus
Контроль (дистиллированная вода) / Control (distilled water)					633	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0,63
Почва с космодрома «Байконур» / Soil from the Baikonur Cosmodrome					254	7	6	5	6	2	3	7	2	3	16,14
Модельная почва с гептилом / Model soil with heptyl					288	4	4	3	6	4	2	6	5	3	12,85
Почва из аэропорта «Шереметьево» / Soil from Sheremetyevo airport					524	1	3	1	4	2	2	3	3	1	3,82
Почва из аэропорта «Домодедово» / Soil from Domodedovo airport					530	1	2	2	5	2	1	4	3	0	3,77

#### Б. Генотоксичность почвы с территорий аэропортов в тесте Эймса

Генотоксичность почвы АО «Домодедово» по результатам теста Эймса на штаммах *S. Typhimutium* TA98 и TA100 соответствует слабой (допустимой) степени, т.е. эта почва не опасна для пассажиров и обслуживающего персонала (табл. 3).

Результаты исследования генотоксичности почвы с территории аэропорта АО «Шереметьево», представленные в табл. 4, соответствуют слабой (допустимой) степени. Таким образом, как и в аэропорту АО «Домодедово», почва с территории аэропорта АО «Шереметьево» не опасна для пассажиров и обслуживающего персонала.

#### В. Оценка генотоксичности почвы с территории космодрома и аэропортов методом хромосомных aberrаций

Данные по генотоксичности методом хромосомных aberrаций образцов почвы с территории космодрома и аэропортов представлены в табл. 5–7. В почве с космодрома «Байконур» количество клеток с aberrациями составило 16,14%, а в почве из аэропортов –3,77-3,82% (в контроле 0,63), что превышает допустимые нормы и опасно для людей. Генотоксичность почвы, загрязненной авиационным керосином, на территориях аэропортов «Шереметьево» и «Домодедово», в тесте хромосомных aberrаций соответствует слабой и безопасна.

Таблица 7. Митотический индекс в пробах почвы из космодрома и аэропортов (% хромосомных aberrаций в опыте / % хромосомных aberrаций в контроле)  
Table 7. Mitotic index in soil samples from the cosmodrome and airports (% chromosomal aberrations in the experiment / % chromosomal aberrations in the control)

	Контроль / Control	Почва с космодрома «Байконур» / Soil from the Baikonur Cosmodrome	Модельная почва с гептилом / Model soil with heptyl	Почва из аэропорта «Шереметьево» / Soil from Sheremetyevo Airport	Почва из аэропорта «Домодедово» / Soil from Domodedovo Airport
Клетки с aberrациями / Cells with aberrations %	0,63	16,14	12,85	3,82	3,77
Частное от деления значений показателя клетки с хромосомными aberrациями в %, в опыте и контроле / The quotient of dividing the indicator values of a cell with chromosomal aberrations in %, in the experiment and control	-	25,6	20,4	6,1	6,0

### Заключение

Проведена оценка генотоксичности проб почвы, отобранных с территорий аэропортов АО «Домодедово» и АО «Шереметьево» (г. Москва), космодрома «Байконур» (Казахстан), модельной почвы, загрязненной гептилом, в тесте Эймса с микроорганизмами *S. Typhimutium* TA98 и TA100 и методом хромосомных aberrаций на корешках лука репчатого *A. cepa*.

В результате проведенных исследований установлено, что загрязнение почвы с места аварии ракеты «Протон-М» на территории космодрома «Байконур» (Казахстан) ракетным топливом диметилгидразином (гептилом) соответствует средней степени и представляет опасность для обслуживающего персонала.

Исследование генотоксичности почвы с территорий аэропортов АО «Домодедово» и АО «Шереметьево» выявило слабую (допустимую) степени загрязнения, и, таким образом, она безопасна для пассажиров и обслуживающего персонала.

### 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 общ. ред. Уйба ВВ. ФГБУ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 2011.
2. Кузнецов АЕ, Градова НБ. Научные основы эковиотехнологии. Учебное пособие для студентов. М.: Мир, 2006.

3. Кузнецов АЕ. Прикладная эковиотехнология. Учебное пособие. Т. 1. Кузнецов АЕ и др. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2010.
4. Маячкина НВ, Чугунова МВ. Особенности биотестирования почв с целью их экотоксикологической оценки. Вестник Нижегородского университета им. Н.И.Лобачевского. 2009;1:84-93.
5. Смоленков АД, Попутникова ТО, Смирнов РС, Родин ИА, Шпигун ОА. Сравнительная оценка токсичности несимметричного диметилгидразина и продуктов его трансформации методами биотестирования. Теоретическая и прикладная экология. 2013;2:85-90.
6. Смоленков АД, Родин ИА, Смирнов РС, Татаурова ОГ, Шпигун ОА. Применение ионной и ион-парной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием для определения несимметричного диметилгидразина и продуктов его трансформации. Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. 2012;53(5):312-319.
7. Касимов НС, и др. Экологический мониторинг ракетно-космической деятельности. Принципы и методы. Под ред. Касимова НС, Шпигуна ОА. М.: Рестарт, 2011.
8. Томилин НВ, Филько ОА, Храброва АВ, Соловьева НЕ, Утсаль ВА, Краснов КА. Генотоксическое и цитотоксическое действие несимметричного диметилгидразина при остром и субхроническом введении. Современные вопросы биомедицины. 2018;2(4):178-185.
9. Гераськин СА, Сарапульцева ЕИ, Цаценко ЛВ, и др. Биологический контроль окружающей среды: генетический мониторинг. Учебное пособие. Под ред. Гераськина СА, Сарапульцевой ЕИ. М.: Издательский центр «Академия», 2010.
10. Прохорова ИМ, Ковалева МИ, Фомичева АН. Оценка митотоксического и мутагенного действия факторов окружающей среды. Методические указания. Ярославль: Ярославский государственный университет, 2003.
11. Allium test. Википедия [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://ru.wikipedia.org/wiki/Allium\\_test](https://ru.wikipedia.org/wiki/Allium_test) (дата обращения: 10.02.2024).
12. Allium test. Викиучебник [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://ru.wikibooks.org/wiki/Allium\\_test](https://ru.wikibooks.org/wiki/Allium_test) (дата обращения: 10.09.2023).
13. Жариков ГА, Марченко АИ, Крайнова ОА. Эколого-токсикологическая оценка воздействия компонентов ракетных топлив (диметилгидразина и авиационного керосина) на объекты окружающей среды. Бактериология. 2023;8(3):26-35. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-26-3

### References

1. Vrednye khimicheskie veshchestva v raketno-kosmicheskoi otrasli. Spravochnik. Pod obshch. red. Uiba VV. FGBU FMBTs im. A.I. Burnazyana FMBA Rossii, 2011. (In Russian).
2. Kuznetsov AE, Gradova NB. Nauchnye osnovy ekobiotekhologii. Uchebnoe posobie dlya studentov. M.: "Mir" Publ., 2006. (In Russian).

3. Kuznetsov AE. Prikladnaya ekobiotekhnologiya. Uchebnoe posobie. T. 1. Kuznetsov AE et al. M.: Binom. Laboratoriya znanii, 2010. (In Russian).
4. Mayachkina NV, Chugunova MV. Peculiarities of soil biotests to evaluate soil ecotoxicity. Vestnik of Lobachevsky University of Nizhni Novgorod. 2009;1:84-93. (In Russian).
5. Smolenkov AD, Poputnikova TO, Smirnov RS, Rodin IA, Shpigun OA. Comparative assessment of toxicity of unsymmetrical dimethyl hydrazine and its decomposition products by bioassay methods. Theoretical and Applied Ecology. 2013;2:85-90. (In Russian).
6. Smolenkov AD, Rodin IA, Smirnov RS, Shpigun OA, Tataurova OG. Use of ion and ion-pair chromatography with mass spectrometric detection to determine unsymmetrical dimethylhydrazine and its transformation products. Moscow University Chemistry Bulletin. 2012;67(5):229-235. (In Russian).
7. Kasimov NS, et al. Ekologicheskii monitoring raketno-kosmicheskoi deyatel'nosti. Printsipy i metody. Pod red. Kasimova NS, Shpiguna OA. M.: "Restart" Publ., 2011. (In Russian).
8. Tomilin NV, Filko OA, Khrabrova AV, Solovyeva NE, Utsal VA, Krasnov KA. Genotoxicity and cytotoxicity of unsymmetrical dimethylhydrazine in acute and subchronic exposure. Modern Issues of Biomedicine. 2018;2(4):178-185. (In Russian).
9. Geras'kin SA, Sarapul'tseva EI, Tsatsenko LV, et al. Biologicheskii kontrol' okruzhayushchei sredy: geneticheskii monitoring. Uchebnoe posobie. Pod red. Geras'kina SA, Sarapul'tsevoi EI. M.: "Akademiya" Publ., 2010. (In Russian).
10. Prokhorova IM, Kovaleva MI, Fomicheva AN. Otsenka mitotoksicheskogo i mutagenogo deystviya faktorov okruzhayushchei sredy. Metodicheskie ukazaniya. Yaroslavl': Yaroslavskii gosudarstvennyi universitet, 2003. (In Russian).
11. Allium test. Vikipediya [Electronic resource]. Available at: [https://ru.wikipedia.org/wiki/Allium\\_test](https://ru.wikipedia.org/wiki/Allium_test) (accessed 10.02.2024). (In Russian).
12. Allium test. Vikiuchebnik [Electronic resource]. Available at: [https://ru.wikibooks.org/wiki/Allium\\_test](https://ru.wikibooks.org/wiki/Allium_test) (accessed 10.09.2023). (In Russian).
13. Zharikov GA, Marchenko AI, Krainova OA. Environmental and toxicological assessment of the impact of rocket fuel components (dimethylhydrazine and aviation kerosene) on environmental objects. Bacteriology. 2023;8(3):26-35. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-26-35 (In Russian).

#### 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 – филиала ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России

Жариков Михаил Геннадьевич, кандидат биологических наук, научный консультант, ООО НПО «ЭкоОйлСервис»

Коломбет Любовь Васильевна, доктор биологических наук, заведующая научной частью, ученый секретарь ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

#### 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

Mikhail G. Zharikov, PhD in Biological Sciences, scientific consultant, NPO EcoOilService LLC

Lyubov V. Kolombet, PhD, DSc in Biological Sciences, Scientific Secretary, Head of Science Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

## Этика нанобиотехнологий: призыв к глобальному регулированию

Нанотехнологии, междисциплинарная область, основанная на использовании уникальных физико-химических свойств наночастиц (НЧ) и наноразмерных материалов, открыла новую сферу возможностей для биологических исследований и биомедицинских приложений. Например, разработка и внедрение мРНК-НР-вакцин против COVID-19 может произвести революцию в вакцинах и методах лечения. Однако нормативно-правовая и этическая база, которая защищает здоровье и безопасность мирового сообщества и окружающей среды, отстает, особенно в отношении нанотехнологий, ориентированных на биологические применения (т.е. бионанотехнологии). Предпринята попытка проиллюстрировать широту и перспективность разработок бионанотехнологий, а также то, как они могут представлять будущие проблемы безопасности. В частности, рассматриваются текущие достижения в оптимизации разработки инженерных НЧ для приложений *in vivo* и обсуждаются нано-биологические взаимодействия, доставка НЧ *in vivo*, улучшение работоспособности человека, наномедицина и влияние НЧ на здоровье человека и окружающую среду.



Arnold AM, Bradley AM, Taylor KL, et al.  
*The Promise of Emergent Nanobiotechnologies for In Vivo Applications and Implications for Safety and Security.*  
*Health Secur.* 2022 Sep-Oct;20(5):408-423. DOI: 10.1089/hs.2022.0014

# Особенности стратифицированных показателей девайс-ассоциированных инфекций в отделениях реанимации и интенсивной терапии для пациентов с COVID-19

Л.А.Любасовская<sup>1,2</sup>, Н.А.Карпун<sup>1</sup>, С.Н.Галкина<sup>1</sup>, А.С.Рыбалко<sup>1</sup>, Ю.А.Персова<sup>1</sup>, Е.А.Золотова<sup>1</sup>, М.Ю.Персов<sup>3</sup>, О.Ю.Филимонова<sup>2</sup>, А.В.Тутельян<sup>4</sup>, С.В.Сметанина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБУЗ «Городская клиническая больница им. В.П.Демикова» Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Российская Федерация;

<sup>3</sup>ФГАУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы», Москва, Российская Федерация;

<sup>4</sup>ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация

Во время пандемии COVID-19 структура оказания медицинской помощи была изменена со смещением приоритетов в сторону инфекционного профиля и уменьшением коечного фонда по другим направлениям оказания медицинской помощи, что привело к сосредоточению смешанного контингента пациентов с различными сопутствующими патологиями в госпиталях COVID-19. Это не могло не отразиться на частоте и структуре заболеваемости внутрибольничными бактериальными инфекциями. В мировой литературе появились публикации, посвященные сравнению частоты девайс-ассоциированных инфекций в стационарах, регистрируемых до пандемии и во время пандемии после перепрофилирования под COVID-19, демонстрирующие увеличение частоты девайс-ассоциированных инфекций в перепрофилированных отделениях.

По результатам данного исследования было показано, что инцидентность девайс-ассоциированных инфекций в госпитале COVID-19 у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии превышает таковые показатели в 2 раза для ИВЛ-ассоциированных событий колонизации нижних дыхательных путей бактериальными патогенами и инфекций кровотока, что согласуется с общемировыми наблюдениями, а для мочевых инфекций – в 7 раз (преимущественно за счет низких титров –  $10^3$  КОЕ/мл).

Отмечена ведущая роль в этиологической структуре инфекций кровотока для коагулазонегативных стафилококков и грамотрицательных бактерий. Низкая частота выделения наблюдалась для *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida*. Для ИВЛ-ассоциированных событий колонизации нижних дыхательных путей бактериальными патогенами абсолютно преобладает этиологическая значимость грамотрицательных бактерий, реже – грибов рода *Candida*, при этом частота *S. aureus*-ассоциированных событий является низкой. Для мочевых инфекций обнаружена высокая частота энтерококк-ассоциированных бактериурий, что, по-видимому, связано с использованием в данном исследовании Европейских критериев катетер-ассоциированной инфекции мочевых путей, в соответствии с которыми значимым титром бактериурии считают  $\geq 10^3$  КОЕ/мл. Высока частота кандидурий и бактериурий, связанных с грамотрицательными бактериями (*Klebsiella pneumoniae* и *P. aeruginosa*).

**Ключевые слова:** COVID-19, госпитальные инфекции, ИВЛ-ассоциированные инфекции, инфекции кровотока, инфекции мочевых путей, девайс-ассоциированные инфекции, внутрибольничные инфекции, стратифицированные показатели заболеваемости, ИВЛ-ассоциированные события

**Для цитирования:** Любасовская Л.А., Карпун Н.А., Галкина С.Н., Рыбалко А.С., Персова Ю.А., Золотова Е.А., Персов М.Ю., Филимонова О.Ю., Тутельян А.В., Сметанина С.В. Особенности стратифицированных показателей девайс-ассоциированных инфекций в отделениях реанимации и интенсивной терапии для пациентов с COVID-19. Бактериология. 2024; 9(1): 22–29. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-22-29

## Для корреспонденции:

Любасовская Людмила Анатольевна, кандидат медицинских наук, врач – клинический фармаколог ГБУЗ «Городская клиническая больница им. В.П.Демикова» Департамента здравоохранения г. Москвы, доцент кафедры микробиологии им. акад. З.В.Ермольевой ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России

Адрес: 109263, Москва, ул. Шкулёва, 4

Статья поступила 19.09.2023, принята к печати 29.03.2024

## For correspondence:

Lyudmila A. Lyubasovskaya, PhD, MD, doctor – clinical pharmacologist of the State Budgetary Institution “V.P.Demikhov City Clinical Hospital” DZM, Associate Professor of the Academician Z.V.Ermolyeva Department of Microbiology, FSBEI DPO “Russian Medical Academy of Continuing Professional Education” of the Ministry of Health of Russia

Address: 4 Shkulev str., Moscow, 109263, Russian Federation

The article was received 19.09.2023, accepted for publication 29.03.2024

# Features of stratified indicators of device-associated infections in intensive care units for patients with COVID-19

L.A.Lyubasovskaya<sup>1,2</sup>, N.A.Karpun<sup>1</sup>, S.N.Galkina<sup>1</sup>, A.S.Rybalko<sup>1</sup>, Yu.A.Persova<sup>1</sup>, E.A.Zolotova<sup>1</sup>, M.Yu.Persov<sup>3</sup>, O.Yu.Filimonova<sup>2</sup>, A.V.Tutelyan<sup>4</sup>, S.V.Smetanina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>V.P.Demikhov City Clinical Hospital of the Moscow Department of Health, Moscow, Russian Federation;

<sup>2</sup>Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

<sup>3</sup>Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation;

<sup>4</sup>Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Moscow, Russian Federation

At the time of the COVID-19 pandemic, the structure of medical care was changed with a shift in priorities towards the infectious profile and a decrease in the bed capacity in other areas of medical care, which led to the concentration of a mixed contingent of patients with various concomitant pathologies in COVID-19 hospitals. This could not but affect the frequency and pattern of incidence of nosocomial bacterial infections. Publications have appeared in the world literature on comparing the frequency of device-associated infections in hospitals registered before the pandemic and during the pandemic after being repurposed for COVID-19, demonstrating an increase in the frequency of device-associated infections in repurposed departments.

According to the results of the study, it was shown that the incidence of device-associated events in the COVID-19 hospital in ICU-patients exceeds those for ventilator-associated events and bloodstream infections by 2 times, which is consistent with global observations, and for urinary infections – seven times (mainly due to low titers –  $10^3$  CFU/mL).

A leading role in the etiological structure of bloodstream infections for Coagulase-negative staphylococci and Gram-negative bacteria was noted, a low frequency of isolation was observed for *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida* spp. For AV-associated events, the etiological significance of gram-negative bacteria absolutely prevails, less often – *Candida* spp., while the frequency of *S. aureus*-associated events is low. For urinary infections, a high frequency of *Enterococcus*-associated bacteriuria was found using the European Criteria for Catheter-associated urinary tract infection, according to which a significant titer of bacteriuria is considered starting from  $10^3$  CFU/mL, a high frequency of Candiduria and gram-negative bacteriuria associated with *Klebsiella pneumoniae* and *P. aeruginosa*.

**Key words:** COVID-19, hospital infections, ventilator-associated infection, bloodstream infection, urinary tract infection, device-associated infection, nosocomial infection, incidence rates, Ventilator-Associated Events

**For citation:** Lyubasovskaya L.A., Karpun N.A., Galkina S.N., Rybalko A.S., Persova Yu.A., Zolotova E.A., Persov M.Yu., Filimonova O.Yu., Tutelyan A.V., Smetanina S.V. Features of stratified indicators of device-associated infections in intensive care units for patients with COVID-19. Bacteriology. 2024; 9(1): 22–29. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-22-29

**Н**а время пандемии COVID-19 структура оказания медицинской помощи была изменена со смещением приоритетов в сторону инфекционного профиля и уменьшением коечного фонда по другим направлениям оказания медицинской помощи, что привело к сосредоточению смешанного контингента пациентов с различными сопутствующими патологиями в госпиталях COVID-19. Это не могло не отразиться на частоте и структуре заболеваемости внутрибольничными бактериальными инфекциями. Пациенты с хронической сопутствующей патологией чаще требуют инвазивных вмешательств (катетеризация центральных вен и мочевого пузыря). Они чаще попадают в отделения реанимации и интенсивной терапии (ОПИТ) и имеют более высокие риски тяжелого течения инфекции с выраженной дыхательной недостаточностью, требующей проведения искусственной вентиляции легких (ИВЛ).

В то же время средства индивидуальной защиты, широко применявшиеся для снижения риска внутригоспитальной передачи вируса COVID-19, стали дополнительным фактором передачи госпитальных бактериальных патогенов, для которых свойственно распространение контактным путем. Это связано с наличием у защитных костюмов длинных рукавов с манжетами, которые трудно подвергаются обработке даже при соблюдении прочих мер, таких как смена перчаток, при манипуляциях от пациента к пациенту, и становятся своеобразными фомитами (фомиты – предметы, контамини-

рованные патогенами, при соприкосновении с которыми возникает риск заражения). Известно, что длинные рукава на медицинской одежде являются значимым фактором передачи бактерий при манипуляциях с катетерами, дренажами и другими медицинскими девайсами. По данным экспериментального исследования по моделированию путей передачи патогенов ESKAPE и *Clostridioides difficile* было обнаружено, что при прямом переносе от кожи к коже и косвенном переносе через фомиты *Staphylococcus aureus* оказался устойчивым к моделируемому обеззараживанию поверхностей фомита, особенно при наличии высоких начальных концентраций на тестируемых материалах, *Pseudomonas aeruginosa* также стойко сохранялась после промывания или обеззараживания тестируемых материалов при прямом и непрямом переносе [1].

Еще одним фактором широкого распространения наиболее значимых бактериальных патогенов в госпиталях COVID-19 стало широкое использование антибиотиков на догоспитальном этапе и в стационаре. На сегодняшний день имеется ограниченное число крупных исследований относительно антимикробной терапии при COVID-19, тем не менее в одном из немногочисленных мета-анализов, включавшем 154 исследования, было показано, что наиболее высокий уровень назначений антибиотиков отмечался в Китае и Северной Америке, при этом самыми распространенными группами антибиотиков в Китае были фторхино-



лоны, в Северной Америке – макролиды и β-лактамы, в Европе частота назначений была ниже, антибиотики представлены в основном препаратами β-лактаминового ряда [2]. При этом лишь в 31 исследовании из 154 были зарегистрированы пациенты с сопутствующей бактериальной коинфекцией, а распространенность бактериальных осложнений составила 8,6% по объединенным данным всех исследований.

В мировой литературе появились публикации, посвященные сравнению частоты девайс-ассоциированных инфекций в стационарах, регистрируемых до пандемии и во время пандемии после перепрофилирования под COVID-19. Было отмечено увеличение частоты девайс-ассоциированных инфекций в перепрофилированных отделениях [3, 4].

**Целью** данного ретроспективного одноцентрового исследования стало оценить частоту и этиологическую структуру бактериальных осложнений девайс-ассоциированных инфекций в ОРИТ для больных COVID-19 в 2021 г.

Исследование проведено на базе обособленного подразделения ГБУЗ «ГКБ им. В.П.Демикова» ДЗМ «Московский клинический центр инфекционных болезней Вороновское» и включало шесть ОРИТ с общим коечным реанимационным фондом 174 койки.

### Пациенты и методы

Все пациенты находились на лечении в ОРИТ с диагнозом «внебольничная пневмония тяжелой степени». Показанием для перевода в ОРИТ служило нарастание дыхательной недостаточности и потребность в эскалации респираторной поддержки до инвазивной или неинвазивной ИВЛ. Всем пациентам при переводе в ОРИТ проводили компьютерную томографию (КТ) легких. У всех пациентов с признаками бактериальной коинфекции по результатам КТ проводили микробиологическое исследование мокроты (при самостоятельном дыхании через естественные дыхательные пути) или бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) у пациентов на ИВЛ или с установленной трахеостомой. Посев крови делали по показаниям при нарастании признаков синдрома системного воспалительного ответа и подозрении на сепсис. Посев мочи делали для пациентов, которые находились в ОРИТ более 1 нед. с установленным мочевым катетером.

Образцы мокроты, БАЛ и мочи отбирали в стерильные пластиковые контейнеры с завинчивающейся крышкой, кровь – в коммерческие флаконы для анализатора VactAlert (BioMerieux), кончик извлеченного центрального венозного катетера (ЦВК) – в стерильные пробирки.

Идентификацию выделенных штаммов проводили на Vitec2Compact (BioMerieux).

Проведен анализ результатов 1724 микробиологических исследований: 909 – из нижних дыхательных путей (781 – мокрота, 128 – БАЛ), 446 образцов крови, 352 – мочи, 17 ЦВК.

Контаминацией при взятии биологического материала считали:

- выделение из проб крови ассоциаций двух и более микроорганизмов,
- наличие в моче микроорганизмов в титре  $<10^3$  КОЕ/мл, ассоциации из более чем двух микроорганизмов или представителей нормальной микрофлоры нижних мочевыводящих путей [5],
- наличие в мокроте или бронхоальвеолярном смыве (БАС) зеленящих стрептококков (*Streptococcus viridans* group), непатогенных коринебактерий и нейссерий, коагулазонегативных стафилококков.

После исключения стерильных проб и проб, трактуемых как контаминация, анализировали видовую принадлежность выделенных микроорганизмов, проводили расчет стратифицированных показателей девайс-ассоциированных инфекций в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями по профилактике инфекционных болезней, на 1000 дней сосудистых и уринарных катетеризаций или на 1000 дней ИВЛ [6].

В данном исследовании при изучении частоты инфекций нижних дыхательных путей мы использовали термин «ИВЛ-ассоциированные события» (Ventilator-Associated Events) колонизации нижних дыхательных путей бактериальными патогенами, а не «ИВЛ-ассоциированная пневмония», т.е. учитывали все случаи выделения ESKAPE-патогенов из нижних дыхательных путей. Это связано с наличием изначального поражения легких у всех пациентов ОРИТ, и выявление ESKAPE-патогенов в мокроте или БАС не позволяло четко дифференцировать колонизацию нижних дыхательных путей от истинной вторичной бактериальной пневмонии.

### Результаты исследования

#### Общая характеристика пациентов

В 2021 г. в обособленном подразделении ГБУЗ «ГКБ им. В.П.Демикова» ДЗМ «Московский клинический центр инфекционных болезней Вороновское» лечение получили 5293 пациента в ОРИТ. Больные провели суммарно в ОРИТ 42 755 койко-дней, (в среднем  $8,03 \pm 2,83$  койко-дня на одного больного). Общая длительность процедур в ОРИТ представлена в табл. 1.

Таблица 1. Основные характеристики ОРИТ для пациентов с COVID-19  
Table 1. Main characteristics of ICU for patients with COVID-19

Процедура / Procedure	Количество пациентов / Number of patients	Длительность, суток / Duration, days	Средняя длительность, суток / Average duration, days
Сосудистые катетеризации / Vascular catheterization	3766	39 091	10,01 ± 5,61
ИВЛ / ALV	2148	19 540	9,1 ± 3,18
Уринарные катетеризации / Urinary catheterization	3810	31 572	8,03 ± 2,83

Таблица 2. Процент положительных проб биологического материала при микробиологическом исследовании, монокультуры и ассоциаций

Table 2. Percentage of positive samples of biological material during microbiological examination, monocultures and associations

	Кровь / Blood	ЦВК / CVC	БАС, мокрота / ALS, sputum	Моча / Urine
Всего проб / Total samples	446	17	909	352
Роста нет / No growth	274 (61%)	9 (53%)	156 (17%)	127 (36%)
Обнаружен рост / Growth detected	172 (39%)	8 (47%)	753 (83%)	225 (64%)
Ассоциации / Associations	10 (6%)	1 (12,5%)	270 (36%)	47 (21%)
Монокультуры / Monocultures	162 (96%)	7 (87,5%)	483 (64%)	178 (79%)

### Этиология и частота девайс-ассоциированных инфекций

Отрицательные гемокультуры составили 61%, отрицательный рост в ЦВК – 47% проведенных микробиологических исследований. В трети случаев стерильными были моча и плевральная жидкость (36 и 39% соответственно), наименьший процент стерильных пробы был среди посевов БАС и мокроты – 17% (табл. 2).

#### Инфекции кровотока

Среди 172 положительных гемокультур 6% ( $n = 10$ ) составили ассоциации микроорганизмов, что расценено как контаминация (табл. 2).

В 162 пробах крови обнаружены монокультуры, при этом наиболее часто выделяемыми микроорганизмами стали ко-

агулазонегативные стафилококки (CoNS) – 67 (41%) изолятов, из них метициллин-резистентных изолятов – 52 (78%), в видовой структуре преобладал вид *Staphylococcus epidermidis* ( $n = 61$ ), *S. haemolyticus* ( $n = 5$ ), *S. hominis* ( $n = 1$ ). Среди прочих видов обнаруживали *Klebsiella pneumoniae* (18%, 29/162), *Acinetobacter baumannii* (14%, 23/162), *Enterococcus faecalis* (12%, 20/162), по 4 изолята (по 2,5%) *P. aeruginosa*, *Candida* spp., *Enterococcus faecium*, 3 изолята *Stenotropomonas maltophilia*, 2 изолята *Corynebacterium indologenes*, по одному изоляту устойчивого к метициллину *Staphylococcus aureus* (MRSA) и *Proteus mirabilis*.

В ЦВК при микробиологическом исследовании в монокультуре обнаружен рост *K. pneumoniae* – 2, *S. epidermidis* – 4 (2 из них – метициллин-резистентные), *P. aeruginosa* – 1, в

Таблица 3. Частота выделения различных видов микроорганизмов из крови и ЦВК на 1000 дней катетеризаций

Вид микроорганизма / Type of microorganism	Инфекции кровотока / Bloodstream infections, $n = 170$		Нижние дыхательные пути / Lower respiratory tract, $n = 688$		Мочевые инфекции, / Urinary infections, $n = 53$	
	Изоляты (кровь + ЦВК) / Isolates (blood + CVC)	На 1000 катетеро- дней / Per 1000 catheter days	Изоляты / Isolates	на 1000 ИВЛ-дней per 1000 / mechanical ventilation days	Изоляты / Isolates	На 1000 дней уринарных катетеризаций / Per 1000 days of urinary catheterizations
Грамположительные микроорганизмы $\Sigma$ / Gram-positive microorganisms $\Sigma$	103	2,6	58	2	99	3
CoNS	71	1,8	-	-	-	-
MRSA	1	0,025	12	0,6	-	-
MSSA	4	0,1	25	1,3	1	0,03
<i>E. faecium</i>	4	0,1	2	0,1	33	1
<i>E. faecalis</i>	21	0,5	19	1	65	2
<i>C. indologenes</i>	2	0,05	-	-	-	-
Грамотрицательные микроорганизмы $\Sigma$ / Gram-negative microorganisms $\Sigma$	64	1,6	758	38,5	86	2,7
<i>K. pneumoniae</i>	31	0,8	277	14	35	1
<i>A. baumannii</i>	23	0,6	335	17	8	0,25
<i>P. aeruginosa</i>	5	0,1	107	5,5	28	1
<i>P. mirabilis</i>	1	0,025	7	0,35	1	0,03
<i>E. coli</i>	1	0,025	26	1,3	13	0,4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	1	0,05	-	-
<i>S. maltophilia</i>	3	0,08	4	0,2	-	-
<i>S. paucimobilis</i>	-	-	1	0,05	1	0,03
<i>Candida</i>	4	0,1	128	6,5	74	2

одном ЦВК обнаружена ассоциация *Escherichia coli* и *E. faecalis*.

Частота выделения микроорганизмов различных видов из крови и ЦВК суммирована и объединена в табл. 3 в общую графу «инфекции кровотока» (ИК).

Таким образом, суммарно у 170 пациентов полученные результаты могут быть расценены как ИК (162 положительных гемокультур и 8 ЦВК с положительным ростом), из которых для 8 доказана ассоциация с катетером, частота ИК составила 4/1000 дней катетеризации (д.к.). При этом грамположительные микроорганизмы выделяли с частотой 2,6/1000, грамотрицательные – 1,6/1000 дней, дрожжевые грибы – 0,1/1000 д.к. Среди грамположительных возбудителей ИК преобладали CoNS (1,8/1000 д.к.), *E. faecalis* (0,5/1000 д.к.), метициллин-чувствительные *S. aureus* (MSSA) и *E. faecium* (0,1/1000 д.к.), MRSA стал самым редко выделяемым грамположительным возбудителем ИК – 0,025/1000 д.к. Следует отметить два случая выделения *C. indologenes*, что составило 0,05/1000 д.к. (табл. 3).

Среди грамотрицательных микроорганизмов преобладали *K. pneumoniae* и *A. baumannii* – 0,8 и 0,6/1000 д.к. соответственно, значительно ниже частота выделения *P. aeruginosa* и *S. maltophilia* – 0,1 и 0,08/1000 д.к., частота выделения *P. mirabilis* и *E. coli* была самой низкой среди грамотрицательных микроорганизмов и аналогична частоте выделения MRSA – 0,025/1000 д.к.

Таким образом, наиболее часто выделяемыми микроорганизмами при ИК стали CoNS – 1,6/1000 д.к., в 2 раза ниже частота выделения *A. baumannii* и *K. pneumoniae* – 0,8 и 0,6/1000 д.к., третьими по частоте выделения стали *E. faecalis* – 0,5/1000 д.к. Низкая частота выделения (0,1/1000 д.к.) отмечена для *Candida*, MSSA, *E. faecium*, *P. aeruginosa*, а также *S. maltophilia* (0,08/1000 д.к.). Самая низкая частота выделения оказалась у MRSA, *C. indologenes*, *P. mirabilis* и *E. coli*.

### Инфекции нижних дыхательных путей

При микробиологическом исследовании содержимого нижних дыхательных путей в 753 (82,8%) пробах выявлен рост микроорганизмов, из них 65 (8,6%) проб оказались контаминированы микрофлорой верхних дыхательных путей (*S. viridans* group, коагулазонегативные стафилококки), что было расценено как контаминация и исключено из исследования. Таким образом, количество положительных проб биоматериала из нижних дыхательных путей составило 688, а частота ИВЛ-ассоциированных событий – 35/1000 дней ИВЛ. Микроорганизмы в монокультуре выделены в 483 (64%) пробах, остальные 36% – в ассоциации (табл. 2).

Частота выделения грамположительных микроорганизмов составила 2/1000 дней ИВЛ, для грамотрицательных – 38,5/1000 дней ИВЛ, для дрожжевых грибов рода *Candida* – 6,5/1000 дней ИВЛ, таким образом, в структуре ИВЛ-ассоциированных осложнений доминировали грамотрицательные микроорганизмы, значительно реже – дрожжевые грибы рода *Candida* и редко – грамположительные бактерии (табл. 3).

Видовой состав грамотрицательных бактерий аналогичен выделенным из положительных гемокультур, при это частота выделения на 1000 дней ИВЛ была максимальной для *A. baumannii* (17/1000 дней ИВЛ), для *K. pneumoniae* –

14/1000 дней, для *P. aeruginosa* – 5,5/1000, для других видов не превышала 1,59/1000 дней ИВЛ.

Таким образом, наиболее часто выделяемыми бактериями из нижних дыхательных путей в ОПИТ стали *A. baumannii* и *K. pneumoniae*, вторыми по частоте – дрожжевые грибы *Candida* (6,5/1000 дней) и *P. aeruginosa* (5,5/1000 дней), остальные виды, в т.ч. *S. aureus*, выделяли с частотой, не превышающей 1,5/1000 дней ИВЛ.

### Мочевые инфекции

В 225 пробах мочи обнаружен рост микроорганизмов, из них 178 в монокультуре, 47 – в ассоциации, из них 12 проб исключены из исследования согласно критериям исключения. Таким образом, истинных бактериурий оказалось 213 на 31 572 дня катетеризаций мочевого пузыря, (6,7/1000 д.к.).

Частота выделения грамположительных кокков составила 3/1000 д.к., грамотрицательных бактерий – 2,7/1000 д.к., дрожжевых грибов рода *Candida* – 2/1000 д.к. Среди грамположительных кокков преобладал *E. faecalis* (2/1000 д.к.), в 2 раза реже – *E. faecium*, *S. aureus* обнаружен в одной пробе мочи (0,303/1000 д.к.).

Среди грамотрицательных бактерий преобладали *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* – 1/1000 д.к., реже – *E. coli* (0,34/1000 д.к.), *A. baumannii* (0,25/1000 д.к.), другие микроорганизмы – *P. mirabilis* и *Sphingomonas paucimobilis* с частотой 0,03/1000 д.к.

### Обсуждение результатов

На сегодняшний день имеется ограниченное количество исследований частоты девайс-ассоциированных инфекций при COVID-19, особенно в отечественной научной литературе. Тем не менее имеются публикации зарубежных авторов, отмечающих общую тенденцию – увеличение частоты их в госпиталях COVID-19 и особенно в ОПИТ [3, 4].

### Инфекции кровотока

Согласно данным крупного ретроспективного исследования в США, которое объединило данные 78 больниц за два периода – до и во время COVID-19, пандемия способствовала увеличению частоты девайс-ассоциированных инфекций кровотока в целом для стационаров и особенно для ОПИТ. Так, частота инфекций кровотока в ОПИТ возросла почти в 2 раза – с 0,68/1000 до 1,16/1000 д.к. В исследовании M.Hyte et al. [4] частота ИК составила 0,8/1000 д.к. в 2019 г. и 1,42/1000 д.к. в 2021 г.

В нашем исследовании частота ИК составила 4/1000 д.к., что в 2,5–3,5 раза выше показателей аналогичных исследований. Если сравнивать данный показатель с данными отечественных исследователей более ранних периодов до COVID-19, то среднемноголетний показатель ИК составлял 0,69/1000 д.к. (2005–2014 гг.) [7]. В 2018 г., согласно данным Роспотребнадзора, наибольшая частота ИК зарегистрирована в Пензенской и Новгородской областях и составила 1,82/1000 и 1,6/1000 д.к. соответственно [8]. Таким образом, следует отметить возрастание частоты ИК в госпитале COVID-19.

В исследовании Мохаммада Г. Фатиха и соавт. [3] было отмечено, что для ИК частота выделения коагулазонегативных стафилококков увеличилась на 130% (0,07 vs 0,17/1000 д.к.),

грибов рода *Candida* – на 56,9% (0,14 vs 0,21/1000 д.к.). В нашем исследовании коагулазонегативные стафилококки также значительно преобладали над другими группами микроорганизмов, частота их выделения составила 1,8/1000 д.к. Однако мы склонны расценивать данную ситуацию как контаминацию пробы крови при взятии, поскольку процент метициллинчувствительных изолятов CoNS был достаточно велик и составил 22%.

Следует отметить, что частота выделения дрожжевых грибов *Candida* из положительных гемокультур в данном исследовании была низкой, как, впрочем, и для *S. aureus*, и составила 0,1/1000 д.к. Частота выделения MSSA и MRSA была сопоставима с таковой у Мохамеда Г. Фатиха и соавт. [3].

Грамотрицательные бактерии выделяли с частотой 1,6/1000 д.к., среди них наибольшая частота выделения была для *K. pneumoniae* (0,8/1000 д.к.) и *A. baumannii* (0,6/1000 д.к.), частота выделения *P. aeruginosa* была низкой – 0,1/1000 д.к.

#### **ИВЛ-ассоциированные события колонизации нижних дыхательных путей бактериальными патогенами**

В отношении ИВЛ-ассоциированных событий в ОПИТ для пациентов с COVID-19 инцидентность составила 35/1000 дней ИВЛ, что в 5 раз выше среднееголетнего показателя по России за 2004–2014 гг., который составлял 6,39/1000 дней ИВЛ [7].

В 2018 г., согласно данным отчета за 2018 г., наибольшая зарегистрированная частота ИВЛ-ассоциированных пневмоний наблюдалась в Приморском крае (17,9/1000 дней ИВЛ) и Республике Хакассия (17,4/1000 дней ИВЛ) [8].

В данном исследовании мы умышленно использовали словосочетание ИВЛ-ассоциированные события, а не ИВЛ-ассоциированная пневмония, поскольку расчет данного стратифицированного показателя проводился на основании положительного высева из материала нижних дыхательных путей, а не документированного случая бактериальной пневмонии. Это обусловлено тем, что на фоне проводимой ИВЛ невозможно четко разделить случаи, где кончается прогрессирование вирусной пневмонии при COVID-19 и начинается бактериальная пневмония, особенно если биоматериал из нижних дыхательных путей содержит бактерии или грибы. Поэтому, возможно, представленная частота ИВЛ-ассоциированных событий несколько завышена за счет колонизированных микроорганизмами пациентов без истинной бактериальной пневмонии.

Известно, что поражение легких вирусной инфекцией является важным фактором риска бактериальной ко-инфекции, особенно при проведении ИВЛ. Риски увеличиваются при большом объеме поражения легких (объем поражения по рентгенологическим признакам соответствует КТ 3–4), что приводит к выраженной дыхательной недостаточности и служит причиной перевода пациента в ОПИТ.

В этиологической структуре абсолютно преобладают грамотрицательные бактерии (38,5/1000 дней ИВЛ), вторыми по частоте стали дрожжевые грибы рода *Candida* (6,5/1000 дней ИВЛ) (таблица 3). Грамположительные кокки выделяли редко (2 на 1000 ИВЛ дней), в одной трети случаев – в ассоциации с другими ESKAPE патогенами. Среди грамотрица-

тельных бактерий преобладает *A. baumannii* (17/1000 дней ИВЛ) и *K. pneumoniae* (14/1000 дней ИВЛ). Обратила на себя внимание значительно более низкая частота выделения *P. aeruginosa* (5,5/1000 дней ИВЛ), другие грамотрицательные бактерии выделяли с частотой 0,05–1,3/1000 дней ИВЛ.

Таким образом, по данным нашего исследования частота ИВЛ-ассоциированных событий, связанных с бактериальными осложнениями в ОПИТ госпиталя COVID-19, превышает максимальные официальные показатели по стране почти в 2 раза, преимущественно за счет грамотрицательных бактерий, относящихся к группе ESKAPE, при этом частота выделения *P. aeruginosa* была значительно ниже таковой для *K. pneumoniae* и *A. baumannii*.

#### **Инфекции мочевыводящих путей (ИМВП)**

В исследовании Мохамеда Г. Фатиха и соавт. [3] для мочевых инфекций не было получено достоверных различий по частоте катетер-ассоциированных мочевых инфекций до и во время пандемии, их частота составила 0,88/1000 и 0,9/1000 д.к. соответственно. В исследовании [4] частота мочевых инфекций составила 1,029/1000 д.к. в 2021 г. по сравнению с 0,755/1000 д.к. в 2019 г. Среднееголетний показатель инцидентности ИМВП по данным российских публикаций до пандемии составлял 0,85/1000 д.к. [7]. Самая высокая частота ИМВП в 2018 г., согласно данным Роспотребнадзора, зарегистрирована в Санкт-Петербурге – 0,76/1000 д.к. [8]. Частота ИМВП по данным нашего исследования составила 6,8/1000 д.к., что в 7 раз выше данных, полученных в приведенных выше исследованиях. Возможно, это связано с тем, что критерии истинной бактериурии, используемые для исследования, были различны. В нашем исследовании критерии истинной бактериурии использовали в соответствии с критериями Европейского общества урологов для катетер-ассоциированных инфекций ( $\geq 10^3$  КОЕ/мл), в статье американских и российских коллег не указаны титры микроорганизмов, которые считались диагностическими. Возможно, низкие титры ( $10^3$  КОЕ/мл), которые мы интерпретировали как значимые, послужили причиной такой большой разницы в частоте катетер-ассоциированных мочевых инфекций. Обращает на себя внимание, что частота выделения грамположительных микроорганизмов в нашем исследовании превышала таковую для грамотрицательных бактерий, что не характерно для инфекций мочевых путей – 3/1000 vs 2,7/1000 д.к., за счет энтерококков, преимущественно *E. faecalis*. Это может служить объяснением большой разницы в частоте мочевых инфекций по сравнению с аналогичными исследованиями, где частота выделения грамположительных и грамотрицательных бактерий составила 0,19/1000 и 0,62/1000 д.к. соответственно. Низкие титры *E. faecalis*, контаминирующие пробы мочи, создают «фоновый шум», что увеличивает частоту катетер-ассоциированных мочевых инфекций. Возможно, титр микроорганизмов в моче  $10^3$  КОЕ/мл не должен рассматриваться как диагностически значимый, особенно если это касается грамположительных бактерий.

Однако следует отметить, что 79% положительных проб мочи были в монокультуре, что может свидетельствовать об истинном характере бактериурии в большинстве случаев.

## Заключение

Было показано, что инцидентность девайс-ассоциированных событий в госпитале COVID-19 у пациентов ОПИТ превышает таковые показатели для ИВЛ-ассоциированных событий и инфекций кровотока в 2 раза, что согласуется с общемировыми наблюдениями, а для мочевых инфекций – в 7 раз (преимущественно за счет низких титров –  $10^3$  КОЕ/мл).

Частота выделения таких возбудителей, как *P. aeruginosa*, *S. aureus*, и дрожжевых грибов рода *Candida* была низкой и составляла 0,1/1000 д.к., преобладали CoNS, выделение которых не исключает контаминацию микрофлорой кожи пациента. Среди грамотрицательных бактерий из гемокультур преобладали *A. baumannii* и *K. pneumoniae*.

Частота катетер-ассоциированной бактериурии в ОПИТ значительно превышала средние показатели по России за счет высокой частоты выделения энтерококков (*E. faecalis* и *E. faecium*), в связи с чем Европейские критерии катетер-ассоциированной бактериурии, которые на сегодня используют в России, следует оценивать в комплексе с клинико-лабораторным статусом пациента, поскольку низкие титры фекальной микрофлоры создают проблему гипердиагностики ИМВП. *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* преобладают среди грамотрицательных возбудителей, частота их выделения составляет 1/1000 д.к. мочевого пузыря, однако этот показатель в 2 раза ниже частоты выделения дрожжевых грибов рода *Candida* из мочи.

ИВЛ-ассоциированные бактериальные события являются наиболее серьезной проблемой девайс-ассоциированных инфекций в ОПИТ для пациентов с COVID-19, но существует проблема их выделения как отдельной нозологии и расчета стратифицированных показателей из-за трудностей, связанных с разделением колонизации дыхательных путей микроорганизмами на фоне прогрессирования вирусной пневмонии и истиной вторичной бактериальной пневмонии.

В структуре преобладают грамотрицательные бактерии – 38,5/1000 дней ИВЛ, среди которых наибольшая частота выделения *A. baumannii* и *K. pneumoniae* – 17/1000 и 14/1000 дней ИВЛ соответственно. Дрожжевые грибы *Candida* также составляют значимую часть микрофлоры, которая колонизирует нижние дыхательные пути на фоне проводимой ИВЛ – 6,5/1000 дней ИВЛ. Грамположительные микроорганизмы, в частности золотистые стафилококки, не играют значимой роли в ИВЛ-ассоциированных бактериальных осложнениях, что, по-видимому, обусловлено ношением респираторов и защитных очков медицинским персоналом и исключением, таким образом, воздушно-капельного пути передачи в госпитале COVID-19.

Таким образом, инцидентность девайс-ассоциированных событий в госпитале COVID-19 у пациентов ОПИТ превышает таковые показатели для популяции в целом, что требует пересмотра подходов к профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в госпиталях подобного профиля.

## Информация о финансировании

Исследования выполнялись в рамках бюджетного финансирования.

## Financial support

The research was carried out within the framework of budget funding.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

## Литература

- Weber KL, LeSassier DS, Kappell AD, Schulte KQ, Westfall N, Albright NC, et al. Simulating transmission of ESKAPE pathogens plus *C. difficile* in relevant clinical scenarios. BMC Infect Dis. 2020 Jun 12;20(1):411. DOI: 10.1186/s12879-020-05121-4
- Langford BJ, So M, Raybardhan S, Leung V, Soucy JR, Westwood D, et al. Antibiotic prescribing in patients with COVID-19: rapid review and meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2021 Apr;27(4):520-531. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.12.018
- Fakih MG, Bufalino A, Sturm L, Huang RH, Ottenbacher A, Saake K, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, central-line-associated bloodstream infection (CLABSI), and catheter-associated urinary tract infection (CAUTI): The urgent need to refocus on hardwiring prevention efforts. Infect Control Hosp Epidemiol. 2022 Jan;43(1):26-31. DOI: 10.1017/ice.2021.70
- Hyte M, Clark C, Pandey R, Redden D, Roderick M, Brock K. How COVID-19 Impacted CAUTI and CLABSI Rates in Alabama. Am J Infect Control. 2023 May 30;S0196-6553(23)00381-4. DOI: 10.1016/j.ajic.2023.05.014
- Available at: <https://d56bochluxqnz.cloudfront.net/documents/full-guideline/EAU-Guidelines-on-Urological-infections-2023.pdf> / European Association of Urology. Guidelines on Urological Infections, 2023
- Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней, 2021 г.
- Орлова ОА. Сравнительная характеристика заболеваемости инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, в Челябинской области и Российской Федерации в целом. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2015;5(84):56-61.
- Акимкин ВГ, Тутельян АВ, Орлова ОА, Голубкова АА, Квасова ОА, Сычева НВ. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП). Информационный бюллетень за 2018 г.

## References

- Weber KL, LeSassier DS, Kappell AD, Schulte KQ, Westfall N, Albright NC, et al. Simulating transmission of ESKAPE pathogens plus *C. difficile* in relevant clinical scenarios. BMC Infect Dis. 2020 Jun 12;20(1):411. DOI: 10.1186/s12879-020-05121-4
- Langford BJ, So M, Raybardhan S, Leung V, Soucy JR, Westwood D, et al. Antibiotic prescribing in patients with COVID-19: rapid review and meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2021 Apr;27(4):520-531. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.12.018
- Fakih MG, Bufalino A, Sturm L, Huang RH, Ottenbacher A, Saake K, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, central-line-associated bloodstream infection (CLABSI), and catheter-associated urinary tract infection (CAUTI): The urgent need to refocus on hardwiring prevention efforts. Infect Control Hosp Epidemiol. 2022 Jan;43(1):26-31. DOI: 10.1017/ice.2021.70
- Hyte M, Clark C, Pandey R, Redden D, Roderick M, Brock K. How COVID-19 Impacted CAUTI and CLABSI Rates in Alabama. Am J Infect Control. 2023 May 30;S0196-6553(23)00381-4. DOI: 10.1016/j.ajic.2023.05.014
- Available at: <https://d56bochluxqnz.cloudfront.net/documents/full-guideline/EAU-Guidelines-on-Urological-infections-2023.pdf> / European Association of Urology. Guidelines on Urological Infections, 2023

6. Sanitarно-epidemiologicheskie trebovaniya po profilaktike infektsionnykh boleznei, 2021 g. (In Russian).
7. Orlova OA. Comparative characteristics of the incidence of healthcare-associated infections in the Chelyabinsk region and in the Russian Federation in total. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2015;5(84):56-61. (In Russian).
8. Akimkin VG, Tutel'yan AV, Orlova OA, Golubkova AA, Kvasova OA, Sycheva NV. Infektsii, svyazannye s okazaniem meditsinskoi pomoshchi (ISMP). *Informatsionnyi byulleten' za 2018 g.* (In Russian).

**Информация о соавторах:**

Карпун Николай Александрович, доктор медицинских наук, заместитель главного врача по медицинской части обособленного подразделения «Московский клинический центр инфекционных болезней Вороновское» ГБУЗ «Городская клиническая больница им. В.П.Демикова» Департамента здравоохранения г. Москвы, доцент кафедры анестезиологии и неотложной медицины ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного медицинского образования» Минздрава России

Галкина Светлана Николаевна, врач-инфекционист обособленного подразделения «Московский клинический центр инфекционных болезней Вороновское» ГБУЗ «Городская клиническая больница им. В.П.Демикова» Департамента здравоохранения г. Москвы

Рыбалко Андрей Сергеевич, заведующий отделением реанимации и интенсивной терапии №3 обособленного подразделения «Московский клинический центр инфекционных болезней Вороновское» ГБУЗ «Городская клиническая больница им. В.П.Демикова» Департамента здравоохранения г. Москвы

Персова Юлия Александровна, врач-пульмонолог ГБУЗ «Городская клиническая больница им. В.П.Демикова» Департамента здравоохранения г. Москвы

Золотова Елена Александровна, заведующая отделением пульмонологии ГБУЗ «Городская клиническая больница им. В.П.Демикова» Департамента здравоохранения г. Москвы

Персов Михаил Юрьевич, кандидат медицинских наук, врач-хирург, доцент кафедры факультетской хирургии МИ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы»

Филимонова Ольга Юрьевна, кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры микробиологии им. акад. З.В.Ермольевой ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России

Тутельян Алексей Викторович, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора

Сметанина Светлана Васильевна, кандидат медицинских наук, главный врач ГБУЗ «Городская клиническая больница им. В.П.Демикова» Департамента здравоохранения г. Москвы

**Information about co-authors:**

Nikolay A. Karpun, MD, PhD, DSc, Deputy Chief Physician of the Medical Unit of the separate unit "Moscow Clinical Center for Infectious Diseases Voronovskoye" of the State Budgetary Institution "V.P.Demikhov City Clinical Hospital" of the Moscow Department of Health, Associate Professor of the Department of Anesthesiology and Emergency Medicine, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education

Svetlana N. Galkina, infectious disease doctor of the separate unit "Moscow Clinical Center for Infectious Diseases Voronovskoye" of the State Budgetary Institution "V.P.Demikhov City Clinical Hospital" of the Moscow Department of Health

Andrey S. Rybalko, head of the department of resuscitation and intensive care No 3 of the separate unit "Moscow Clinical Center for Infectious Diseases Voronovskoye" of the State Budgetary Institution "V.P.Demikhov City Clinical Hospital" of the Moscow Department of Health

Yulia A. Persova, pulmonologist of the State Budgetary Institution "V.P.Demikhov City Clinical Hospital" of the Moscow Department of Health

Elena A. Zolotova, Head of the Department of Pulmonology of the State Budgetary Institution "V.P.Demikhov City Clinical Hospital" of the Moscow Department of Health

Mikhail Yu. Persov, PhD, MD, surgeon, Associate Professor of the Department of faculty Surgery, Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia

Olga Yu. Filimonova, PhD, MD, senior lecturer of the Z.V.Yermolyeva Department of Microbiology, Russian Medical Academy of Continuing Professional Education

Alexey V. Tutelyan, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, MD, PhD, DSc, Head of the Laboratory of Infections Associated with the Provision of Medical Care, Federal Budgetary Institution, Central Research Institute of Epidemiology of Rosпотребнадзор

Svetlana V. Smetanina, PhD, MD, Chief Physician of the State Budgetary Institution "V.P.Demikhov City Clinical Hospital" of the Moscow Department of Health

**НОВОСТИ НАУКИ****Впервые обнаружена защитная броня супербактерии, обеспечивающая цель для лечения**

Многие бактерии и археи обладают двумерным массивом белков, или S-слоем, который покрывает поверхность клетки и играет решающую роль в физиологии клеток. Здесь мы сообщаем о кристаллической структуре SlpA, основного белка S-слоя бактериального патогена *Clostridioides difficile*, и используем электронную микроскопию для изучения организации и сборки S-слоя. Кристаллическая решетка SlpA имитирует сборку S-слоя в клетке за счет мозаичного расположения треугольных призм над клеточной стенкой, соединенных отчетливыми гребнями, обращенными к окружающей среде. Поразительно, массив очень компактный, с диаметром пор всего  $\sim 10\text{\AA}$  по сравнению с другими S-слоями (30–100 $\text{\AA}$ ). Открытые на поверхности гибкие гребни частично незаменимы для общей структуры и сборки, хотя мутант, лишенный этой области, становится восприимчивым к лизоциму, важной молекуле в защите хозяина. Таким образом, наша работа дает представление об организации S-слоя и обеспечивает основу для разработки терапевтических средств, специфичных для *C. difficile*.

Lanzoni-Mangutchi, P., Banerji, O., Wilson, J. et al.  
Structure and assembly of the S-layer in *C. difficile*.

*Nat Commun.* 2022 Feb 25;13(1):970. DOI: 10.1038/s41467-022-28196-w

# Оценка показателей качества экспериментальных серий вакцины чумной живой, полученных методом глубинного культивирования

А.В.Костроминов, С.Е.Гостищева, Н.В.Абзаева, Г.Ф.Иванова, А.А.Фисун, М.А.Иванова

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь, Российская Федерация

Проведены исследования экспериментальных серий препарата вакцины чумной живой, полученных методом глубинного культивирования, на предмет соответствия основным показателям качества, а также оценка стабильности в течение срока годности (3 года). В работе использовали жидкую питательную среду на основе панкреатического гидролизата казеина и пептона сухого ферментативного с добавлением аммония молибденовокислого в качестве ростостимулирующей добавки. Получено 10 экспериментальных серий препарата, при этом среднее содержание живых микробных клеток составило 39,2%, срок термостабильности – 9,2 суток, потери в массе при высушивании – 1,8%. Анализ стабильности показателей при хранении показал, что через год доля живых микробных клеток снизилась на 1,1–1,8%, через два года – на 2,5%, через три – на 3,6%. Проведенные исследования показали, что экспериментальные серии вакцины чумной живой, полученные методом глубинного культивирования, соответствуют требованиям нормативной документации и остаются стабильными в течение регламентированного срока годности (3 года).  
*Ключевые слова:* глубинное культивирование, параметры биомассы, вакцина чумная живая, количество живых микробных клеток, стабильность, иммуногенность

**Для цитирования:** Костроминов А.В., Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Фисун А.А., Иванова М.А. Оценка показателей качества экспериментальных серий вакцины чумной живой, полученных методом глубинного культивирования. Бактериология. 2024; 9(1): 30–37. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-30-37

## The analysis of the quality of experimental batches of live plague vaccine obtained by submerged cultivation method

A.V.Kostrominov, S.E.Gostishcheva, N.V.Abzaeva, G.F.Ivanova, A.A.Fisun, M.A.Ivanova

Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation

We did the research of growing biomass of the vaccine strain of the plague microbe *Yersinia pestis* EV using a liquid nutrient medium. We produced experimental batches of the live plague vaccine using the submerged cultivation method and also examined the main quality indicators and stability during the shelf life (3 years). The composition of the liquid nutrient medium included pancreatic casein hydrolyzate and enzymatic dry peptone with ammonium molybdate as a growth-stimulating additive. We received 10 experimental series of the vaccine. The produced series had the following characteristics: average number of living microbial cells – 39.2%, thermal stability period – 9.2 days, weight loss upon drying – 1.8%. An analysis of vaccine stability showed that after a year the number of living microbial cells decreased by 1.1–1.8%, after two years by 2.5%, after three – by 3.6%. The results showed that experimental series of live plague vaccine obtained by submerged cultivation meet the requirements of regulatory documentation and remain stable during shelf life (3 years).  
*Key words:* submerged cultivation, biomass parameters, live plague vaccine, average number of living microbial cells, stability, immunogenicity

**For citation:** Kostrominov A.V., Gostishcheva S.E., Abzaeva N.V., Ivanova G.F., Fisun A.A., Ivanova M.A. The analysis of the quality of experimental batches of live plague vaccine obtained by submerged cultivation method. Bacteriology. 2024; 9(1): 30–37. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-30-37

### Для корреспонденции:

Костроминов Артём Валерьевич, младший научный сотрудник научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15  
Телефон: (865-2) 26-2050  
ORCID: 0000-0003-2228-5038

Статья поступила 25.10.2023, принята к печати 29.03.2024

### For correspondence:

Artem V. Kostrominov, Junior Researcher of the research and production laboratory of plague vaccines Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor

Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol, 355035, Russian Federation  
Phone: (865-2) 26-2050  
ORCID: 0000-0003-2228-5038

The article was received 25.10.2023, accepted for publication 29.03.2024

Из всех этапов промышленного биотехнологического производства медицинских иммунобиологических препаратов этап культивирования биомассы является самым значимым, во многом определяющим количественные и качественные характеристики конечного продукта [1].

В случае, когда культура растет на поверхности питательной среды (жидкой или плотной), потребляя содержащиеся в ней субстраты и выделяя в эту среду продукты метаболизма, способ культивирования называют поверхностным. Когда же микроорганизмы распределяются по всему объему жидкой питательной среды, культивирование называют глубинным (жидкофазным) [2].

Преимущество глубинного культивирования заключается в стандартности условий проведения процесса, высокой производительности, возможностях тонкого управления кинетикой роста популяции, изучения основных закономерностей прохождения во времени микробиологических процессов на клеточном уровне. Именно поэтому глубинное культивирование широко применяется в настоящее время в производстве биологических препаратов [3, 4].

Для препарата «Вакцина чумная живая» накопление биомассы проводится поверхностным методом на аппарате культивирования микроорганизмов Шестеренко. В дальнейшем планируется переход на биотехнологию глубинного культивирования биомассы, поэтому одной из задач является поиск и отработка методик, способствующих получению препарата вакцины чумной, соответствующей требованиям нормативной документации.

Для освоения производства коммерческой вакцины в ферментере необходимо отработать параметры биотехнологии глубинного выращивания [5]. С целью поиска альтернативного и эффективного промышленного метода производства вакцины были проведены исследования в области глубинного выращивания биомассы на жидкой питательной среде, получения экспериментальных серий препарата, их контроля по основным показателям качества, оценки стабильности в течение срока годности (3 года).

**Цель исследования** – оценить качественные показатели экспериментальных серий вакцины чумной живой, полученных методом глубинного культивирования.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи: отработать оптимальные параметры биотехнологии, изучить кинетику популяции микробных клеток, определить основные показатели качества полученных экспериментальных серий вакцины чумной живой, проанализировать данные о стабильности экспериментального препарата в процессе хранения.

## Материалы и методы

### Штаммы

В работе использовали вакцинный штамм *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ из коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора (депонирован в ГКПМ III–IV групп патогенности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России под №910301). Для испытания по показателю «Специфическая активность: Иммуногенность» использовали вирулентный штамм чумного микроба *Y. pestis* 231 из коллекции патоген-

ных микроорганизмов ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора (инвентарный номер 52).

### Питательные среды

Питательные среды для культивирования изготовлены в лаборатории питательных сред для культивирования микроорганизмов I–IV групп патогенности ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора.

Для контроля препарата использовали агар Хоттингера pH 7,1 ± 0,1 с добавлением натрия сернистоокислого и pH 7,3 ± 0,1.

Для накопления бактериальной массы использовали экспериментальную питательную среду следующего состава:

панкреатический гидролизат казеина	89,0 мл
пептон сухой ферментативный	20,0 г
натрий хлористый	5,0 г
натрий фосфорнокислый	
двузамещенный 12-водный	4,0 г
аммоний молибденовоокислый 4-водный	0,5 г
дистиллированная вода	до 1 л

### Получение экспериментальных серий препарата

Выращивание проводили в биореакторе BIOSTAT A (SARTORIUS, Германия) объемом 5 л с автоматической регулировкой мешалки. Для засева использовали посевную культуру, изготовленную путем последовательных пересевов на этапах I, II и III генерации вакцинного штамма согласно Промышленному регламенту на производство вакцины чумной живой ПР 01897080-09-16, при этом посевная доза подбиралась так, чтобы концентрация клеток в ферментере была не менее 20•10<sup>6</sup> м.к./мл питательной среды. Культивировали 16–18 ч при 27 ± 1°C, непрерывной аэрации, подкормке 40%-м раствором глюкозы. pH поддерживали на уровне 7,0–7,4 [6]. Через 10 ч выращивания и в последующем каждые 2 ч отбирали пробы для определения количества микробных клеток. При наступлении стационарной фазы (прекращение нарастания оптической концентрации взвеси и сохранение pH на одном уровне) процесс культивирования останавливали.

Вакцину взвесь осаждали, отбирали осадок и разводили его средой высушивания до концентрации (70–80)•10<sup>9</sup> м.к./мл. Разливали в ампулы по 2 мл, лиофилизировали и герметизировали. Всего было получено 10 экспериментальных серий препарата по 300 ампул каждая.

**Определение общей концентрации микробных клеток** проводили визуальным методом с помощью отраслевой стандартный образец (ОСО) мутности бактериальных взвесей 42-28-85-соответствующего года выпуска (10 МЕ).

Вакцину восстанавливали 1,8 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида. В стандартную пробирку вносили 0,1 мл восстановленного препарата и добавляли 0,9%-й раствор натрия хлорида до достижения концентрации ОСО мутности бактериальных взвесей.

Концентрацию микробных клеток (ОК) определяли по формуле:

$$OK = \frac{((0,1+V) \times 10^9)}{0,1}, \quad (1)$$



где:

0,1 – объем испытуемого образца, мл;

V – объем 0,9%-го раствора натрия хлорида, использованный при разведении пробы, мл;

$1 \cdot 10^9$  – концентрация чумного микроба, соответствующая ОСО мутности бактериальных взвесей 42-28-85-соответствующего года выпуска (10 ME).

Концентрацию живых микробных клеток в вакцине определяли бактериологическим методом согласно НД ЛСР-005759/08-231120 на вакцину чумную живую, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций.

Процент содержания живых микробных клеток в препарате вычисляли для каждого образца путем посева на чашки с питательным агаром. Для этого делали последовательные десятикратные разведения 0,9%-м раствором натрия хлорида от  $10^{-1}$  (к 0,5 мл микробной взвеси добавляли 4,5 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида) до  $10^{-8}$ . Из двух последних пробирок с разведением  $10^{-7}$  и  $10^{-8}$  высевали пипеткой соответственно по 0,1 мл взвеси на 3 чашки с агаром. Учет результатов проводили через  $48 \pm 2$  ч выдерживания посевов при температуре  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Концентрацию живых микробных клеток (% живых м.к.) вычисляли для каждого образца отдельно по формуле:

$$\% \text{ живых м.к.} = \frac{\text{БК} \times 100\%}{\text{ОК}} \quad (2)$$

где:

БК – количество живых микробных клеток в 1 мл;

ОК – общая концентрация.

Значение концентрации живых микробных клеток в серии вакцины приравнивали к среднему арифметическому значению трех образцов, которое должно составлять не менее 25% от общего количества.

#### Определение термостабильности

Показатель термостабильности должен составлять не менее 4 суток, рассчитывали по формуле:

$$t = \frac{0,3 \times 14}{\lg A_0 - \lg A_n}, \quad (3)$$

где t – показатель термостабильности в сутках;

$\lg A_0$  – логарифм первоначального числа живых микробных клеток в 1 мл;

$\lg A_n$  – логарифм числа живых микробных клеток в 1 мл через 14 суток хранения вакцины при температуре  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ;

0,3 – постоянная величина;

14 – срок хранения вакцины при температуре  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  в сутках.

#### Определение потери в массе при высушивании

Потерю в массе при высушивании определяли гравиметрическим методом согласно ОФС.1.2.1.0010.15 ГФ XIII. Показатель не должен превышать 4%.

#### Определение иммуногенности

Имуногенность полученных серий вакцины чумной живой определяли в соответствии с методикой, изложенной

в НД ЛСР-005759/08-231120 на вакцину чумную живую, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций. Морских свинок и мышей иммунизировали дозами  $8 \cdot 10^2$ ,  $4 \cdot 10^3$ ,  $2 \cdot 10^4$  и  $1 \cdot 10^5$  живых микробных клеток. Морским свинкам вакцину вводили подкожно в объеме 0,5 мл, мышам – в объеме 0,2 мл. Заражение животных проводили на 21-е сутки после вакцинации, вводя подкожно 200 Dcl вирулентных микробов штамма *Y. pestis* 321. Контрольным животным вводили по 1 Dcl вирулентного штамма. Наблюдение за животными вели в течение 21 суток со дня заражения.

Имуногенность вакцин оценивали по методу Кербера в модификации И.П.Ашмарина и А.А.Воробьева (1962) и выражали показателем  $ED_{50}$ , рассчитанным по формуле:

$$\lg ED_{50} = \lg Dn - \delta (\sum Li - 0,5), \quad (4)$$

где Dn – максимальная из используемых доз;

$\delta$  – логарифм кратности использованных разведений;

Li – отношение числа животных, выживших после заражения данной дозой, к общему числу животных, которым эта доза была введена;

0,5 – постоянный коэффициент при сравнении.

$ED_{50}$  – для морских свинок не должна превышать  $1 \cdot 10^4$ , для белых мышей –  $4 \cdot 10^4$  живых микробных клеток.

#### Лабораторные животные

В опытах (иммунизация, заражение) использованы аутбредные белые мыши массой 18–20 г и морские свинки породы агути массой 250–300 г. В опыт брали животных после 5–10-дневного карантина. В процессе содержания животных поддерживали рекомендуемый режим питания согласно приказу МЗ СССР №1179 (1983). Работа с животными проводилась в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», СП 3.3686-21, «Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских целях» (2010), Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и других научных целях (Страсбург, 1986). Количество животных для экспериментов брали с учетом получения статистически достоверных результатов.

#### Статистическая обработка материала

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием стандартного пакета компьютерных программ Microsoft Excel. Определяли основные характеристики описательной статистики: среднее ( $M$ ), ошибку среднего ( $m$ ).

Достоверность различия средних рассчитывали по критерию Стьюдента ( $t$ ) для коэффициентов вариации, уровень значимости  $p$  выбран  $< 0,05$ .

При сопоставлении результатов разницу считали достоверной, если максимальное значение доверительного интервала одной сравниваемой величины было меньше минимального значения другой.

## Результаты и обсуждение

В ряде наших экспериментов наиболее перспективной для глубинного культивирования вакцины чумной живой

Таблица 1. Накопление биомассы *Y. pestis* EV при глубинном культивировании  
 Table 1. Accumulation of *Y. pestis* EV biomass during submerged cultivation

Параметры биомассы / Biomass parameters	исх. / ref.	Возраст культуры, ч / Culture age, h					
		10	12	14	16	18	20
Общая концентрация микробных клеток, млн/мл / Total concentration of microbial cells, million m.c./ml	20,0 ± 1,1	58,0 ± 3,4	400,0 ± 7,8	2100,0 ± 12,1	9920,0 ± 11,2	11000,0 ± 6,7	10800,0 ± 13,4
Концентрация живых микробных клеток, млн/мл / Concentration of living microbial cells, million m.c./ml	19,9 ± 3,3	55,4 ± 2,7	359,6 ± 5,7	1730,4 ± 13,6	6596,8 ± 10,4	6611,0 ± 8,2	6393,6 ± 11,7
Доля живых микробных клеток, % / Proportion of living microbial cells, %	99,7 ± 2,1	95,6 ± 3,3	89,9 ± 6,6	82,4 ± 11,0	66,5 ± 9,2	60,1 ± 5,4	59,2 ± 11,5

Таблица 2. Основные показатели качества экспериментальных серий вакцины чумной живой, полученной глубинным методом культивирования  
 Table 2. Main quality indicators of experimental batches of live plague vaccine obtained by submerged cultivation

Серия / Series	Показатели качества / Quality indicators			
	Концентрация микробных клеток, млрд/мл / Microbial cell concentration, billion/ml	Содержание живых микробных клеток / Content of living microbial cells, %	Термостабильность, сутки / Thermal stability, day	Потеря в массе при высушивании / Weight loss on drying, %
1	50	27,8 ± 2,2	14,1	0,9
2	50	39,9 ± 1,4	6,4	1,5
3	55	56,6 ± 3,1	9,8	2,3
4	50	41,0 ± 2,3	9,4	1,3
5	50	43,6 ± 1,1	8,0	2,2
6	55	38,4 ± 3,2	7,4	1,8
7	50	42,1 ± 0,9	9,4	2,0
8	55	34,1 ± 2,2	13,0	1,4
9	50	33,8 ± 2,4	6,6	2,4
10	50	34,6 ± 3,7	7,8	2,2
<i>M ± m</i>	51,5 ± 0,8	39,2 ± 2,6	9,2 ± 0,9	1,8 ± 0,2

Таблица 3. Оценка количества живых микробных клеток в экспериментальных сериях вакцины чумной живой на разных сроках хранения препарата при температуре 4 ± 2°C  
 Table 3. The assessment of number of living microbial cells in experimental batches of live plague vaccine in different periods of the drug storage at temperature of 4 ± 2°C

Серии / № Series	На дату выпуска / As of release date	Содержание живых микробных клеток / Content of living microbial cells, %		
		Срок хранения / Shelf life		
		1 год / 1 year	2 года / 2 years	3 года / 3 years
Экспериментальная вакцина				
1	27,8 ± 2,2	26,7 ± 2,2	26,4 ± 1,1	25,8 ± 3,8
2	39,9 ± 1,4	38,9 ± 1,6	37,3 ± 2,4	35,8 ± 0,2
3	56,6 ± 3,1	55,3 ± 3,1	53,1 ± 2,2	51,7 ± 3,4
<i>M ± m</i> (1–3)	41,4 ± 10,2	40,3 ± 10,5	38,9 ± 9,5	37,8 ± 9,2
4	41,0 ± 2,3	38,5 ± 3,0	-	-
5	43,6 ± 1,1	42,2 ± 2,3	-	-
6	38,4 ± 3,2	36,3 ± 2,4	-	-
7	42,1 ± 0,9	40,8 ± 3,0	-	-
8	34,1 ± 2,2	33,4 ± 2,5	-	-
9	33,8 ± 2,4	31,5 ± 2,5	-	-
10	34,6 ± 3,7	32,4 ± 3,7	-	-
<i>M ± m</i> (4–10)	38,23 ± 1,7	36,4 ± 1,7	-	-

В связи с более поздним сроком изготовления серии 4–10 исследованы только через 1 год хранения. / Due to the later date of manufacture, series 4-10 were investigated only after 1 year of storage.

Таблица 4. Оценка показателя иммуногенности экспериментальных серий вакцины чумной для морских свинок  
 Table 4. The assessment of the immunogenicity index of experimental batches of plague vaccine with guinea pigs

Доза иммунизации (ж.м.к.) / Immunization dose (l.m.c.)	Количество животных в опыте / Number of animals in the experiment	Количество выживших животных / Number of surviving animals	Патологоанатомическая картина / Pathological picture	Бактериологическое исследование / Bacteriological study
800	6	2	У всех павших животных наличие патологоанатомических изменений, характерных для чумы / All dead animals had pathological changes characteristic of plague	В посевах органов павших животных – рост чумного микроба / In crops of organs of dead animals, there is growth of the plague microbe
4000	6	3		
20 000	6	4		
100 000	6	6		
Контроль / Control 1 DCL	6	0		

$\lg ED_{50} = \lg 92400 - 0,699(2,5 - 0,5) = 4,9657 - 0,699 \times 1,5 = 4,9657 - 1,398 = 3,5677$   
 $ED_{50} = 3696$  живых м.к. / live m.c.

Таблица 5. Оценка показателя иммуногенности экспериментальных серий вакцины чумной для белых мышей  
 Table 5. The assessment of the immunogenicity index of experimental batches of plague vaccine with white mice

Доза иммунизации (ж.м.к.) / Immunization dose (l.m.c.)	Количество животных в опыте / Number of animals in the experiment	Количество выживших животных / Number of surviving animals	Патологоанатомическая картина / Pathological picture	Бактериологическое исследование / Bacteriological study
800	6	1	У всех павших животных наличие патологоанатомических изменений, характерных для чумы / All dead animals had pathological changes characteristic of plague.	В посевах органов павших животных – рост чумного микроба / In crops of organs of dead animals, there is growth of the plague microbe.
4000	6	4		
20 000	6	3		
100 000	6	4		
Контроль / Control 1 DCL	5	0		

$\lg ED_{50} = \lg 92400 - 0,699(2,01 - 0,5) = 4,9657 - 0,699 \times 1,51 = 4,9657 - 1,0555 = 3,9102$   
 $ED_{50} = 8132$  живых м.к. / live m.c.

признана среда на основе панкреатического гидролизата казеина с пептоном сухим ферментативным. В качестве ростостимулирующей добавки использовался аммоний молибденовокислый [7–9].

Дальнейшие исследования были направлены на изготовление и изучение экспериментальных серий препарата. С целью отработки биотехнологии производства препарата вакцины чумной живой методом глубинного культивирования было изготовлено 10 экспериментальных серий.

Известна технология глубинного культивирования для изготовления препарата вакцины чумной живой [10, 11]. Для оптимизации биотехнологического процесса культивирования биомассы на разработанной питательной среде были скорректированы параметры биотехнологии. Через 2 ч после засева реактора включали барботирование, азрацию осуществляли в объеме 0,5–0,8 м<sup>3</sup>/ч. Перемешивание осуществлялось в автоматическом режиме периодически на скорости 200–250 об./мин. Культивировали 16–20 ч при 27°C и непрерывной азрации. Через 10 ч выращивания и последующие каждые 2 ч отбирали пробы для определения количества микробных клеток. При наступлении стационарной фазы процесс культивирования останавливали.

На этапе культивирования вакцинного штамма важное значение имеет информация о физиологическом состоянии культуры микроорганизмов, в частности общее количество микробных клеток и количество живых микробных клеток [12]. Определение этих показателей позволяет точно определить время наступления стационарной фазы и прекращения процесса культивирования.

В отдельные сроки исследования накопление живых микробных клеток претерпевает различные изменения, зависящие от параметров культивирования (табл. 1). После фазы приспособления, длящейся 6–9 ч, наступает логарифмическая фаза, характеризующаяся максимальным увеличением количества микробных клеток. Так, через 10 ч роста отмечается увеличение количества живых микробных клеток почти в 2,8 раза по сравнению с засеянным. Еще через 2 ч количество живых микробов возрастает до 359,6 млн/мл, а по достижении 18 ч – 6611,0 млн/мл. В следующие 2 ч как общее количество, так и количество живых микробных клеток практически не претерпевают изменений, что говорит об окончании логарифмической фазы и наступлении стационарной.

Очевидно, что в течение логарифмической фазы происходит накопление как общего числа, так и количества жизнеспособных микробных клеток. Однако доля жизнеспособности ближе к наступлению стационарной фазы снижается, особенно при замедлении роста на 16–18 ч культивирования, что не противоречит кинетике роста микроорганизмов [13].

Полученную микробную взвесь выдерживали при 2–8°C не менее 24 ч до полной седиментации. Отбирали осадок, разводили его стабилизатором до концентрации 70–80 млрд м.к./мл, разливали в ампулы по 2 мл и лиофилизировали.

Экспериментальные серии вакцины были проконтролированы согласно спецификации НД ЛСР-005759/08-231120 по показателям качества, а именно: описание, подлинность, время растворения, седиментационная устойчивость, про-

ходимость через иглу, рН, потеря массы при высушивании, средняя масса и отклонение от средней массы, отсутствие посторонних бактерий и грибов, специфическая безопасность, специфическая активность (концентрация микробных клеток и количество живых микробных клеток), термостабильность [14].

На момент выпуска экспериментальных серий вакцины, выращенной глубинным методом, препарат имел следующие параметры (табл. 2).

Показано, что все полученные образцы по основным показателям качества соответствовали нормативной документации.

Средний процент количества живых микробных клеток составил 39,2%, срок термостабильности – 9,2 суток, потери массы при высушивании – 1,8%.

Остальные показатели соответствовали нормам, отраженным в спецификации НД и промышленном регламенте на производство [15].

Срок годности вакцины определяет процесс частичной гибели живых микробных клеток в процессе хранения [16]. Остальные свойства препарата в течение установленного срока годности, который составляет 3 года, практически не претерпевают изменений [17]. Поэтому для изучения стабильности полученных экспериментальных серий, был проведен мониторинг показателя содержания живых микробных клеток во времени (1, 2 и 3 года хранения). Полученные данные представлены в табл. 3.

Анализ результатов показал, что через год количество живых микробных клеток снизилось на 1,1–1,8%, через два года - на 2,5%, через три – на 3,6% (различия статистически не значимы,  $p \leq 0,05$ ). Таким образом, несмотря на некоторое снижение количества живых микробных клеток в препарате, данный показатель оставался в пределах нормы, и ни в одном случае не произошло уменьшения ниже регламентированного уровня (25%).

Проведенные исследования доказывают, что препарат вакцины чумной живой, полученный методом глубинного культивирования, сохраняет стабильность показателя концентрации живых микробных клеток в течение всего срока годности.

Важнейшим критерием качества препарата вакцины чумной живой и одновременно показателем ее эффективности является иммуногенная активность [18–20].

Определение иммуногенности проводили на белых мышах и морских свинках. Животных иммунизировали, через 21 сутки заражали 200 Dcl вирулентного штамма *Y. pestis* 231. Для контрольного заражения неиммунизированных животных использовали дозу в 1 Dcl этого же штамма. Наблюдение за зараженными животными вели в течение 21 суток. Контрольные животные пали от чумы в течение 10 суток после заражения. Органы павших животных исследовали бактериологически, высевая их методом отпечатков на пластинки с агаром Хоттингера рН 7,1 ± 0,1. Положительным на чуму результатом считали выделение культуры *Y. pestis*. Данные по иммуногенности представлены в табл. 4, 5.

Из приведенных данных видно, что показатель ED<sub>50</sub> в экспериментальных сериях был не выше допустимого, что свидетельствует об иммунологической эффективности экспериментального препарата [21, 22].

Таким образом, проведенные исследования показали, что экспериментальные серии вакцины чумной живой, полученные методом глубинного культивирования на питательной среде на основе панкреатического гидролизата казеина и пептона сухого ферментативного с добавлением аммония молибденовокислого, соответствуют требованиям нормативной документации и остаются стабильными в процессе хранения. Данные разработки показали возможность внедрения биотехнологии производства препарата глубинным методом после проведения работ по масштабированию процесса для возможности перевода его из лабораторного в промышленный.

### **Информация о финансировании**

*Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.*

### **Financial support**

*The work was carried out within the framework of budget funding.*

### **Конфликт интересов**

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

### **Conflict of interest**

*The authors declare that there is no conflict of interest.*

### **Литература**

1. Еремин СА, Волох ОА, Шепелев ИА, Дальвадянец СМ, Дятлов ИА. Разработка новых технологических схем и масштабирование процессов получения антигенов чумного и туляремийного микробов. Проблемы особо опасных инфекций. 2006;2:58-61.
2. Карпов АА. Масштабирование процессов глубинного культивирования микроорганизмов в биореакторах. Автореф. дисс ... канд. биол. наук. Щелково, 2004.
3. Волох ОА, Шепелёв ИА, Заднова СП, Крепостнова ИМ, Еремин СА. Изучение биокинетических особенностей и оптимизация условий культивирования штаммов холерного вибриона – продуцентов протективных антигенов, перспективных для внедрения в производство. Проблемы особо опасных инфекций. 2008;1(95):52-55. DOI: 10.21055/0370-1069-2008-1(95)-52-55
4. Еремин СА, Алешина ЮА, Комиссаров АВ, Громова ОВ, Васин ЮГ, Никифоров АК, и др. Методы и технологии культивирования холерного вибриона (обзор). Проблемы особо опасных инфекций. 2013;4:95-101. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-4-95-101
5. Дудукалова ТН, Гончарова МН, Тинкер АИ, Быкова ЗА, Верховцева ГН, Печникова ИВ, и др. Использование автоматизированной реакторной установки для выращивания штамма ЕВ чумного микроба. Микробиология. Эпидемиология и профилактика инфекционных заболеваний. Часть II. 1971;37-144.
6. Дроздовская ФК, Муравьева НК, Глушко ЛИ, Филиппов АФ. Изменение интенсивности дыхания чумного микроба при глубинном выращивании и в процессе хранения его в высушенном состоянии. Проблемы особо опасных инфекций. 1969;1:186-188.
7. Василенко ЕИ, Курилова АА, Ковтун ЮС, Катунина ЛС. К вопросу о питательных средах для непрерывного культивирования микроорганизмов. Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями. Материалы Всероссийской научно-практической конференции. 2016;140-144.
8. Терентьева ЛИ, Аптасарова РА, Орел ЛЛ. Молибденовокислый аммоний как фактор повышения чувствительности жидких питательных сред для диа-

- гностики чумного микроба. Современные аспекты эпиднадзора за особо опасными инфекциями: Тезисы XIII конф. противочумных учреждений Средней Азии и Казахстана. Алма-Ата, 1990;91-93.
9. Абзаева НВ, Катунина ЛС, Иванова ГФ, Гостищева СЕ, Ростовцева ДВ, Костроминов АВ, и др. Питательная среда жидкая для выращивания и сброса биомассы вакцинного штамма чумного микроба *Yersinia pestis* EV. Патент №2745504, дата регистр. 17.07.2020.
10. Тетерин ВВ, Ежов АВ, Бирюков ВВ, Мохов ДА, Багин СВ, Хонин АЗ, и др. Способ получения препарата на основе вакцинного штамма чумного микроба. Патент №0002510825, опубл. 04.10.2014.
11. Ковтун АЛ, Рогожин АЗ, Неprанов ВП, Нестеров ЮЕ, Черкасов НА. Способ получения биомассы чумного микроба. Патент №2102472, опубл. 20.01.1998.
12. Медведев АП, Кошнерова ЛА, Юдашин АМ, Жаков ВМ. Оптимизация глубинного культивирования производственных штаммов сальмонелл в реакторах. Ученые записки УО «Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины». 2011;47(1):94-97.
13. Попова ПЮ, Микшис НИ, Тучков ИВ, и др. Базовые методы и универсальные конструкции в создании и усовершенствовании чумных вакцин: практические решения. Современные проблемы эпидемиологии и гигиены. Материалы VII Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2015;173-174.
14. Основные требования к вакцинным штаммам чумного микроба. Методические указания. МУ 3.3.1.1113-02.
15. Нормативная документация НД ЛСР-005759/08-2311020. Вакцина чумная живая (Вакцина для профилактики чумы), лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного scarificationного нанесения и ингаляций. Ставрополь, 2020;21.
16. Тинкер АИ. Выживаемость микробов в производственных сериях чумной вакцины EV, приготовленных на плотных и жидких питательных средах. Проблемы особо опасных инфекций. 1971;4(20):71-76.
17. Файбич ММ. Стабилизация вакцинных препаратов в процессе высушивания и хранения. Успехи микробиологии. 1983;18:193-215.
18. Будыка ДА. Изучение иммуногенности противочумных профилактических препаратов в феномене «переживания». Проблемы особо опасных инфекций. 2001;1(81):128-133.
19. Дальвадянец СМ, Дятлов ИА, Еремин СА, Щуковская ТН, Саяпина ЛВ, Сергеева ГМ, и др. Исследования по иммунизации против чумы. Сообщение 4. Опыт ревакцинации волонтеров «химической» и живой чумной вакцинами. Проблемы особо опасных инфекций. 2006;1(91):57-61.
20. Ефременко АА, Будыка ДА, Абзаева НВ. Иммуногенные свойства экспериментальных серий вакцины чумной живой сухой. Естествознание и гуманизм: сборник научных работ. 2005;2(1):38.
21. Анисимова ТИ. Анализ качества чумной живой сухой вакцины по жизнеспособности и ЕД<sub>50</sub> для морских свинок и белых мышей. Профилактика особо опасных инфекций. Эпизоотология, микробиология и специфика профилактики чумы. 1976;1:84-89.
22. Коновалова ЖА, Атлас АГ, Дубровина ВИ. Некоторые пути оптимизации процесса производства вакцины чумной живой и способы оценки ее иммуногенности. Acta Biomedica Scientifica. 2013;2(2):192-196.
3. Volokh OA, Shepelev IA, Zadnova SP, Krepostnova IM, Yeremin SA. A Study of Biokinetic Peculiarities and Optimization of the Conditions for Culturing *Vibrio cholerae* Strains Overproducing Protective Antigens Suitable for Use in the Production. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2008;1(95):52-55. DOI: 10.21055/0370-1069-2008-1(95)-52-55 (In Russian).
4. Eremin SA, Aleshina YuA, Komissarov AV, Gromova OV, Vasin YuG, Nikiforov AK, et al. Methods and Technologies of Cholera *Vibrio* Cultivation (Scientific Review). Problems of Particularly Dangerous Infections. 2013;4:95-101. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-4-95-101 (In Russian).
5. Dudukalova TN, Goncharova MN, Tinker AI, Bykova ZA, Verkhovtseva GN, Pechnikova IV, et al. Ispol'zovanie avtomatizirovannoi reaktornoj ustanovki dlya vyrashchivaniya shtamma EV chumnogo mikroba. Mikrobiologiya. Epidemiologiya i profilaktika infektsionnykh zabolovani. Chast' II. 1971;37-144. (In Russian).
6. Drozdovskaya FK, Murav'eva NK, Glushko LI, Filippov AF. Izmenenie intensivnosti dykhaniya chumnogo mikroba pri glubinnom vyrashchivanii i v protsesse khraneniya ego v vysushennom sostoyanii. Problems of Particularly Dangerous Infection. 1969;1:186-88. (In Russian).
7. Vasilenko EI, Kurilova AA, Kovtun YuS, Katunina LS. K voprosu o pitatel'nykh sredakh dlya nepreryvnogo kul'tivirovaniya mikroorganizmov. Sovremennye tekhnologii v epidemiologicheskom nadzore za aktual'nymi infektsiyami. Materialy Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii. 2016;140-144. (In Russian).
8. Terent'eva LI, Aptasrova RA, Orel LL. Moliбdenovo-kislyi ammonii kak faktor povysheniya chuvstvitel'nosti zhidkikh pitatel'nykh sred dlya diagnostiki chumnogo mikroba. Sovremennye aspekty epidnadzora za osobo opasnymi infektsiyami: Tezisy. XIII конф. protivochumnykh uchrezhdenii Srednei Azii i Kazakhstana. Alma-Ata, 1990;91-93. (In Russian).
9. Abzaeva NV, Katunina LS, Ivanova GF, Gostishcheva SE, Rostovtseva DV, Kostrominov AV, i dr. Pitatel'naya sreda zhidkaya dlya vyrashchivaniya i sbrosa biomassy vaksinnogo shtamma chumnogo mikroba *Yersinia pestis* EV. Patent №2745504, data registr. 17.07.2020. (In Russian).
10. Teterin VV, Ezhov AV, Biryukov VV, Mokhov DA, Bagin SV, Khonin AZ, et al. Sposob polucheniya preparata na osnove vaksinnogo shtamma chumnogo mikroba. Patent №0002510825, opubl. 04.10.2014. (In Russian).
11. Kovtun AL, Rogozhin AZ, Nepranov VP, Nesterov YuE, Cherkasov NA. Sposob polucheniya biomassy chumnogo mikroba. Patent №2102472, opubl. 20.01.1998. (In Russian).
12. Medvedev AP, Koshnerova LA, Yudasin AM, Zhakov VM. Optimizatsiya glubinnogo kul'tivirovaniya proizvodstvennykh shtammov sal'monell v reaktorah. Transactions of the educational establishment "Vitebsk the Order of 'the Badge of Honor' State Academy of Veterinary Medicine". 2011;47(1):94-97. (In Russian).
13. Popova PYu, Mikshis NI, Tuchkov IV, et al. Bazovye metody i universal'nye konstruksii v sozdanii i usovershenstvovanii chumnykh vaksin: prakticheskie resheniya. Sovremennye problemy epidemiologii i higieny: materialy VII Vseros. nauch.-prakt. конф. molodykh uchenykh i spetsialistov Rospotrebnadzora. Saint Petersburg: ELBI-SPb, 2015;173-174. (In Russian).
14. Osnovnye trebovaniya k vaksinnym shtammam chumnogo mikroba. Metodicheskie ukazaniya. MU 3.3.1.1113-02. (In Russian).
15. Normativnaya dokumentatsiya ND LSR-005759/08-2311020. Vaksina chumnaya zhivaya (Vaksina dlya profilaktiki chumy), liofilizat dlya prigotovleniya suspensii dlya in'ektsii, nakozhnogo skarifikatsionnogo naneseniya i ingalyatsii. Stavropol', 2020;21. (In Russian).
16. Tinker AI. Vyzhivaemost' mikrobov v proizvodstvennykh seriyakh chumnoi vaksiny EV, prigotovlennykh na plotnykh i zhidkikh pitatel'nykh sredakh. Problems of Particularly Dangerous Infections. 1971;4(20):71-76. (In Russian).
17. Faibich MM. Stabilizatsiya vaksinnyykh preparatov v protsesse vysushivaniya i khraneniya. Uspekhi mikrobiologii. 1983;18:193-215. (In Russian).
18. Budyka DA. Izuchenie immunogenosti protivochumnykh profilakticheskikh preparatov v fenomene «perezhivaniya». Problems of Particularly Dangerous Infections. 2001;1(81):128-133. (In Russian).

## References

19. Dalvadyants SM, Dyatlov IA, Yeremin SA, Schukovskaya TN, Sayapina LV, Sergheeva GM, et al. Plague immunization studies. Communication 4. An experience of volunteer revaccination with the "chemical" and live plague vaccines. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2006;1(91):57-61. (In Russian).
20. Efremenko AA, Budyka DA, Abzaeva NV. Immunogenные свойства экспериментальной серии вакцин чумной живой сухой. *Estestvoznaniye i gumanizm: sbornik nauchnykh rabot*. 2005;2(1):38. (In Russian).
21. Anisimova TI. Analiz kachestva chumnoi zhivoi sukhoi vaksiny po zhiznesposobnosti i ED<sub>50</sub> dlya morskikh svinok i belykh myshei. *Profilaktika osobno opasnykh infektsii. Epizootologiya, mikrobiologiya i spetsifika profilaktiki chumy*. 1976;1:84-89. (In Russian).
22. Konovalova ZA, Atlas AG, Dubrovina VI. Some ways of production process of live plague vaccine and techniques of evaluation the immunogenicity (review). *Acta Biomedica Scientifica*. 2013;2(2):192-196. (In Russian).

#### Информация о соавторах:

Гостищева Светлана Евгеньевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0000-0001-9891-3665

Абзаева Наталья Вячеславовна, кандидат биологических наук, заведующая научно-производственной лабораторией чумных вакцин ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0000-0002-7418-9673

Иванова Галина Филипповна, кандидат медицинских наук, врач-бактериолог научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0000-0001-6127-6738

Фисун Алиса Анатольевна, научный сотрудник научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0000-0003-3400-9989

Иванова Марина Алексеевна, лаборант-исследователь научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0000-0001-9199-3885

#### Information about co-authors:

Svetlana E. Gostischeva, PhD in Biological Sciences, senior researcher of scientific and production laboratory of plague vaccines, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor  
ORCID: 0000-0001-9891-3665

Natalia V. Abzaeva, PhD in Biological Sciences, head of the production laboratory of plague vaccine research and production, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor  
ORCID: 0000-0002-7418-9673

Galina F. Ivanova, PhD, MD, bacteriologist of the research and production laboratory of plague vaccines, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor  
ORCID: 0000-0001-6127-6738

Alice A. Fisun, researcher at the research and production laboratory of plague vaccines, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor  
ORCID: 0000-0003-3400-9989

Marina A. Ivanova, laboratory research assistant at the research and production laboratory of plague vaccines, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor  
ORCID: 0000-0001-9199-3885

## Антибактериальные свойства эвкалиптового масла против двух основных возбудителей заболеваний полости рта

В медицине и стоматологии существуют серьезные опасения по поводу появления устойчивых к антибиотикам патогенов, поскольку они представляют значительную угрозу глобальному здоровью, особенно здоровью полости рта. Растущая обеспокоенность тем, что патогены полости рта могут развить устойчивость к стандартным профилактическим мерам, вызывает необходимость в альтернативных мерах по предотвращению роста этих патогенов без индукции микробной устойчивости. Данное исследование направлено на оценку антибактериальных свойств эвкалиптового масла (ЭМ) против двух основных возбудителей заболеваний полости рта: *Streptococcus mutans* и *Enterococci faecalis*.

Разведенное ЭМ выявило значительное снижение общей абсорбции против *S. mutans* и *E. faecalis* по сравнению с контролем ( $p \leq 0,001$ ). При измерении биопленок биопленки *S. mutans* и *E. faecalis* были уменьшены примерно в 60 и 30 раз соответственно по сравнению с группой без ЭМ ( $p \leq 0,001$ ).

Основываясь на результатах этого исследования, использование ЭМ в качестве органического соединения можно рассматривать как дополнительный инструмент для предотвращения роста патогенов в полости рта, вызывающих кариес зубов и эндодонтическую инфекцию.



Balhaddad AA, AlSheikh RN.

*Effect of eucalyptus oil on Streptococcus mutans and Enterococcus faecalis growth.*  
*BDJ Open*. 2023 Jul 6;9(1):26. DOI: 10.1038/s41405-023-00154-8

# Влияние антибактериальных препаратов в свободной и липосомальной формах на отдельные показатели иммунного статуса экспериментальных животных

А.А.Ефременко<sup>1</sup>, И.А.Базиков<sup>1</sup>, Д.В.Ефременко<sup>2</sup>, О.В.Логвиненко<sup>2</sup>, Е.Л.Ракитина<sup>2</sup>, Ф.И.Базиков<sup>1</sup>, В.И.Ефременко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ставрополь, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь, Российская Федерация

Было проведено сравнительное изучение влияния антибактериальных препаратов (рифампицин, азитромицин, ампициллин) в свободной и липосомальной формах на субпопуляции лимфоцитов (Т-лимфоциты, Т-хелперы, В-лимфоциты), провоспалительных цитокинов (интерлейкин-1 $\beta$  (ИЛ-1 $\beta$ ), ИЛ-6, фактор некроза опухоли- $\alpha$ ), противовоспалительного цитокина ИЛ-4 у экспериментальных животных. Установлено, что антибиотики способствовали сдвигу лимфоцитарной формулы в сторону уменьшения процентного содержания Т-лимфоцитов и их субпопуляции Т-хелперов, что может приводить к ослаблению клеточного иммунного ответа макроорганизма. Из общих закономерностей оказываемого на популяцию В-лимфоцитов эффекта антибактериальных препаратов в свободной и липосомальной формах можно отметить (так же как и в случае с Т-клетками) наименьшие отклонения у опытных групп животных от показателей контроля на 5-е сутки эксперимента, т.е. к этому времени происходила нормализация соответствующих значений. Однако в целом можно констатировать менее значимое влияние инкапсулированных в липосомы препаратов на субпопуляции лимфоцитов в эксперименте по сравнению с интактной формой. Воздействие антибиотиков на цитокинпродуцирующую активность заключалось в повышении выработки провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$  и фактора некроза опухоли- $\alpha$ , угнетении секреции ИЛ-6 и противовоспалительного ИЛ-4, что может способствовать нежелательным гипериммунным реакциям. Максимальные изменения фиксировались в первые сутки эксперимента, а к 5-м суткам значения приближались к норме. При этом включение антибиотиков в липосомы обеспечивало уменьшение вариативности секреторной функции клеток иммунной системы, таким образом позволяя ослабить влияние препаратов на показатели гомеостаза организма.

**Ключевые слова:** показатели иммунного статуса, рифампицин, азитромицин, ампициллин, липосомальная форма антибиотиков, субпопуляции лимфоцитов, цитокины

**Для цитирования:** Ефременко А.А., Базиков И.А., Ефременко Д.В., Логвиненко О.В., Ракитина Е.Л., Базиков Ф.И., Ефременко В.И. Влияние антибактериальных препаратов в свободной и липосомальной формах на отдельные показатели иммунного статуса экспериментальных животных. Бактериология. 2024; 9(1): 38–45. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-38-45

## Effect of antibacterial preparations in free and liposomal forms on individual indicators of immune status of experimental animals

А.А.Ефременко<sup>1</sup>, И.А.Базиков<sup>1</sup>, Д.В.Ефременко<sup>2</sup>, О.В.Логвиненко<sup>2</sup>, Е.Л.Ракитина<sup>2</sup>, Ф.И.Базиков<sup>1</sup>, В.И.Ефременко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Stavropol State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Stavropol, Russian Federation;

<sup>2</sup>Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation

A comparative study of the effect of antibacterial drugs (rifampicin, azithromycin and ampicillin) in free and liposomal forms on lymphocyte subpopulations (T-lymphocytes, T-helpers, B-lymphocytes), pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), anti-inflammatory cytokine IL-4 in experimental animals was conducted. It has been found that antibiotics have contributed to a shift in the lymphocytic formula towards a decrease in the percentage of T-lymphocytes and their subpopulation of T-helpers, which may lead to a weakening of the cellular immune response of the macro-organism. Of the general patterns, it can be noted (as

### Для корреспонденции:

Ефременко Анна Александровна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии ФБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»

Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310  
Телефон: (8652) 35-2475

Статья поступила 28.09.2023, принята к печати 29.03.2024

### For correspondence:

Anna A. Efremenko, PhD, MD, Associate Professor of the Department of Microbiology, Stavropol State Medical University

Address: 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian Federation  
Phone: (8652) 35-2475

The article was received 28.09.2023, accepted for publication 29.03.2024

well as in the case of T-cells) the smallest deviations in experimental groups of animals from the control indicators on the 5th day of the experiment, i.e. by this time the corresponding values were normalized. In general, however, a less significant effect of liposomal drugs on lymphocyte subpopulations can be noted in the experiment compared to intact form. The effect of antibiotics on cytokine-producing activity was to increase the production of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , inhibition of IL-6 secretion and anti-inflammatory IL-4, which may contribute to undesirable hyperimmune reactions. The maximum changes were recorded on the first day of the experiment, and by 5 days the values approached the norm. At the same time, the inclusion of antibiotics in liposomes ensured a decrease in the variability of the secretory function of the cells of the immune system, thus allowing to weaken the effect of drugs on the homeostasis indicators of the body.

*Key words: indicators of immune status, rifampicin, azithromycin, ampicillin, liposomal form of antibiotics, lymphocyte subpopulations, cytokines*

**For citation:** Efremenko A.A., Bazikov I.A., Efremenko D.V., Logvinenko O.V., Rakitina E.L., Bazikov F.I., Efremenko V.I. Effect of antibacterial preparations in free and liposomal forms on individual indicators of immune status of experimental animals. *Bacteriology*. 2024; 9(1): 38–45. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-38-45

**В** соответствии с «Научным нанорубрикаторм» липосомы являются бионаноструктурами, поскольку толщина их мембран, построенных из липидов, не превышает 8–10 нм. Упакованные в нанокапсулы липосом различные лекарственные препараты приобретают новые полезные свойства, связанные со способностью этих наноконтейнеров преодолевать анатомические и клеточные барьеры организма, пролонгировать действие лекарств, снижать их токсичность [1–6].

Введенные различными путями экспериментальным животным пустые (интактные) липосомы, являясь биологическими образованиями, вызывают функциональные изменения биохимических показателей, характеризующих состояние белкового, углеводного, липидного обмена, уровня активности некоторых ферментов организма [7–10]. Как правило, эти изменения нормализуются в течение 10 суток после введения липосом. Наряду с влиянием интактных липосом на биохимический статус организма, они также активируют различные показатели иммунной системы, способствуют повышению эффективности иммунного ответа на вводимые экспериментальным животным иммуногены, оказывают протективный эффект при их заражении вирулентными микроорганизмами [11–13].

Имеются опытные данные, показывающие, что введение пустых липосом сопровождается увеличением популяции Т-лимфоцитов, субпопуляции Т-хелперов и не оказывает существенного влияния на количество В-лимфоцитов [14–16]. Однако сведения о влиянии вводимых в организм липосомальных форм лекарственных препаратов на различные иммунологические показатели носят отрывочный характер, не являясь достаточными для полноценного понимания данного вопроса.

**Цель:** сравнительное изучение влияния антибиотиков в свободной и липосомальной формах на субпопуляции лимфоцитов, некоторых провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у экспериментальных животных.

## Материалы и методы

Мембраны липосом формировали из липидов и фосфолипидов головного мозга свиней, которые экстрагировали хлороформно-этанольной экстракцией с дальнейшим осаждением липидов добавлением ацетона [17].

Водорастворимые антибиотики азитромицин и ампициллин включали во внутреннюю полость липосом методом «ручного встряхивания» с последующими шестью циклами «замораживания-оттаивания». Жирорастворимый антибио-

тик рифампицин иммобилизовали в мембрану липосом методом «выпаривания в обращенной фазе». Данный способ позволяет получать крупные липосомы диаметром до 800 нм с высоким процентом иммобилизованных в них антибиотиков [18, 19]. От не связавшихся с липосомами водорастворимых антибиотиков освобождались диализом.

Количество включенного в липосомы антибиотика определяли методом серийных разведений, используя в качестве стандарта свободный антибиотик [20, 21]. Мембраны липосомальных препаратов разрушали добавлением Тритона X-100, высвобождая иммобилизованные антибиотики. Включение водорастворимых антибиотиков азитромицина и ампициллина в липосомальные везикулы составило  $92 \pm 3\%$ , жирорастворимого рифампицина –  $99 \pm 1\%$ .

Эксперимент проводили на нелинейных белых мышах обоего пола массой 18–20 г с соблюдением правил, предусмотренных Европейской комиссией по надзору за проведением лабораторных и других опытов с участием экспериментальных животных разных видов. Мыши находились в стандартных условиях с естественной сменой освещения и соблюдением стандартного пищевого рациона. У всех животных был свободный доступ к пище и воде.

Экспериментальным животным вводили в свободной и инкапсулированной в липосомы формах рифампицин и азитромицин перорально по 1 мл в концентрации 0,5 мг/мл и 0,6 мг/мл соответственно, ампициллин – по 0,1 мл внутримышечно в концентрации 1 мг/мл. Контролем служили чистые белые мыши. Каждая исследуемая группа состояла из 5 белых мышей.

Кровь на исследование брали на 1, 3 и 5-е сутки после введения препаратов. В крови определяли лимфоциты, экспрессирующие рецепторы CD3 (Т-лимфоциты), CD4 (Т-хелперы) и CD19 (В-лимфоциты), интерлейкины (ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-1 $\beta$ ), фактор некроза опухолей (ФНО).

Клетки, экспрессирующие CD<sup>+</sup>-антиген, фенотипировали с использованием однопараметрических моноклональных антител, меченных флуоресцинизоцианидом (FITC) и фикоэритрином (PE) производства Coltag laboratories, США (CD3 FITC, CD4 PE, CD19 PE). На каждую белую мышь брали 3 пробирки, вносили 20 мкл гепаринизированной крови и в каждую пробирку добавляли по 5 мкл моноклональных антител CD3, CD4, CD19. Экспозиция в темноте 30 мин при комнатной температуре. Затем в каждую пробирку добавляли по 450 мкл рабочего раствора для лизиса эритроцитов. Для приготовления рабочего раствора, лизирующего эритроциты, к 1 мл лизирующего основного раствора



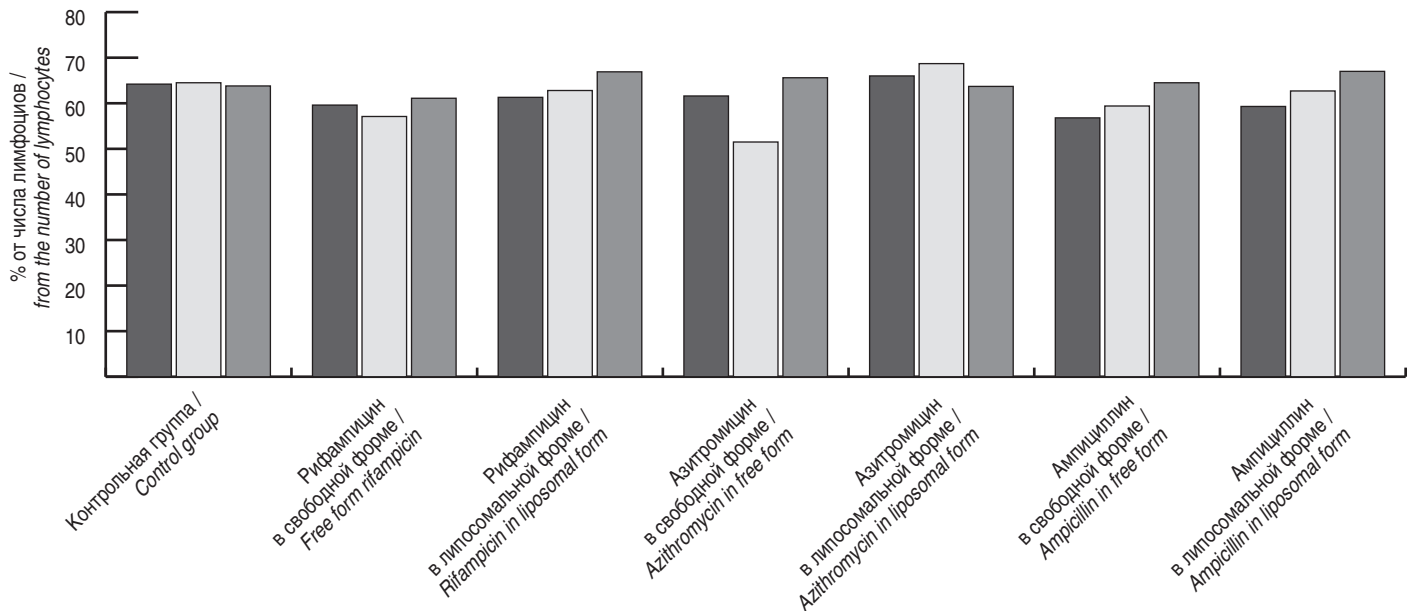


Рис. 1. Динамика показателя содержания Т-лимфоцитов при введении белым мышам антибиотиков в свободной и липосомальной формах: ■ – 1-е сутки, □ – 3-и сутки, ▒ – 5-е сутки.  
 Fig. 1. Dynamics of the T-lymphocyte content when white mice are administered antibiotics in free and liposomal forms: ■ – 1 day, □ – 3 days, ▒ – 5 days.

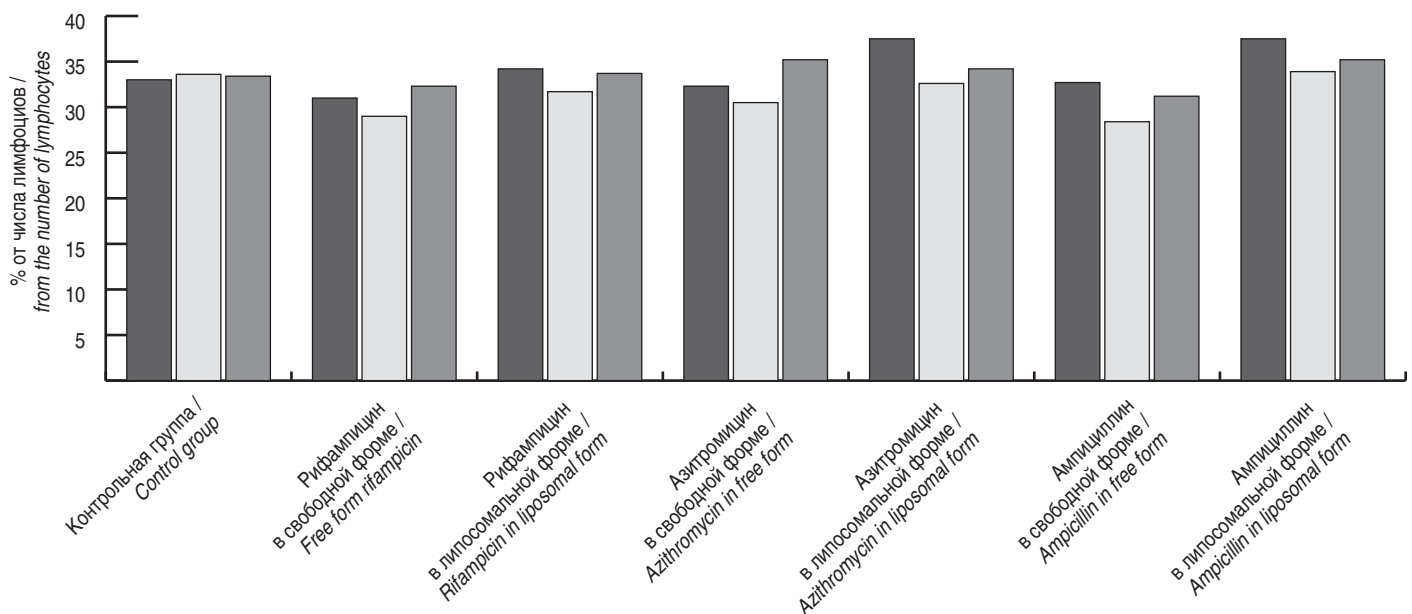


Рис. 2. Динамика показателя содержания Т-хелперов при введении белым мышам антибиотиков в свободной и липосомальной формах: ■ – 1-е сутки, □ – 3-и сутки, ▒ – 5-е сутки.  
 Fig. 2. Dynamics of the T-helper content when white mice are administered antibiotics in free and liposomal forms: ■ – 1 day, □ – 3 days, ▒ – 5 days.

добавляли 9 мл дистиллированной воды. Пробирки помещали в темноту на 10 мин при комнатной температуре. Центрифугировали 5 мин при 2000 об./мин. Надосадочную жидкость удаляли и к осадку добавляли 450 мкл раствора для разведения клеток. Перемешивали на вортексе, затем в течение 5 мин центрифугировали при 2000 об./мин. Супернатант удаляли и добавляли в каждую пробирку по 450 мкл раствора для разведения клеток. Пробу фенотипировали на проточном цитометре FACSCalibur (США), используя универсальное программное обеспечение CellQuest.

Количество интерлейкинов в сыворотке крови биомоделей определяли методом иммуноферментного анализа [22]

с использованием диагностических тест-систем Biosource производства Immunoassay Kit (США) для определения количества ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-4, ИЛ-6 и ФНО.

Величину оптической плотности измеряли при  $\lambda$  450 нм на 8-канальном автоматическом фотометре Titertrek Multiskan Plus (Великобритания).

Количественный показатель содержания интерлейкинов определяли по графику, построенному при измерении оптической плотности образцов с известной концентрацией.

Статическую обработку полученных результатов проводили с использованием компьютерной программы Microsoft Office Excel, 2010.

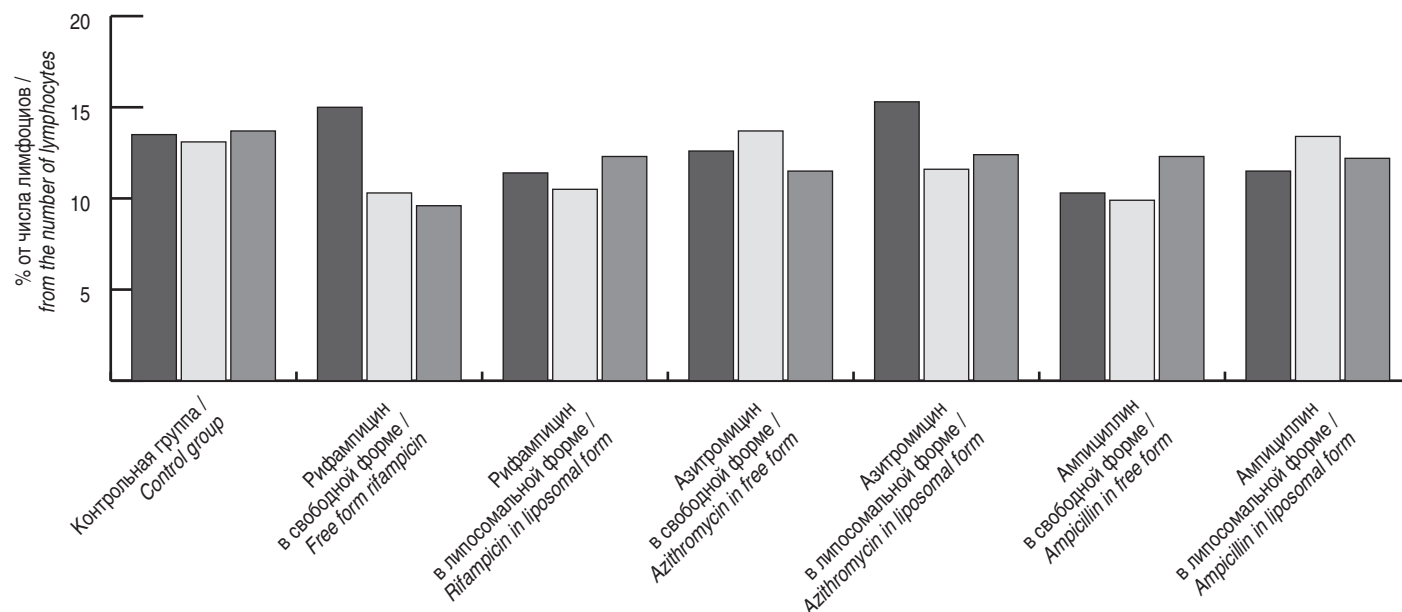


Рис. 3. Динамика показателя содержания В-лимфоцитов при введении белым мышам антибиотиков в свободной и липосомальной формах: ■ – 1-е сутки, □ – 3-и сутки, ▒ – 5-е сутки.

Fig. 3. Dynamics of the B-lymphocyte content when white mice are administered antibiotics in free and liposomal forms: ■ – 1 day, □ – 3 days, ▒ – 5 days.

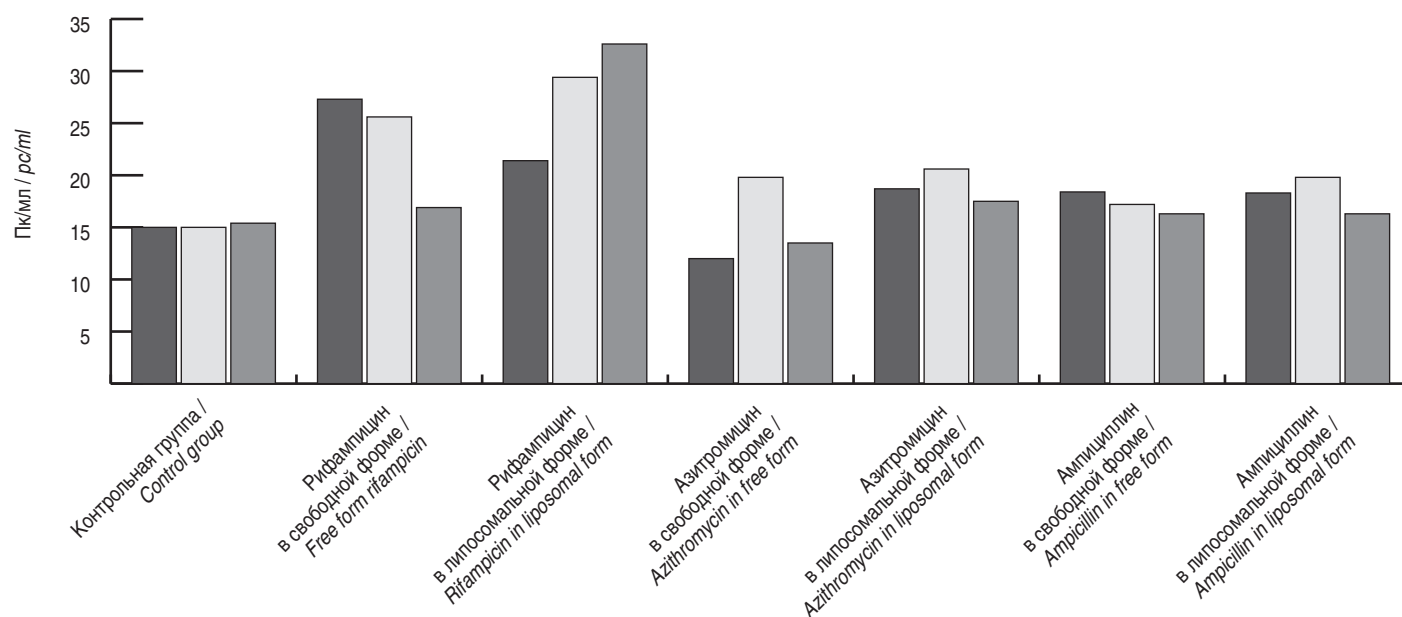


Рис. 4. Динамика показателя содержания ИЛ-1β при введении белым мышам антибиотиков в свободной и липосомальной формах: ■ – 1-е сутки, □ – 3-и сутки, ▒ – 5-е сутки.

Fig. 4. Dynamics of IL-1β content when white mice were administered antibiotics in free and liposomal forms: ■ – 1 day, □ – 3 days, ▒ – 5 days.

### Результаты исследования и их обсуждение

Для изучения действия антибиотиков на иммунокомпетентные клетки нами были исследованы популяции Т- и В-лимфоцитов и субпопуляция Т-хелперов у контрольной группы животных при введении антибиотиков в свободном виде и антибиотиков, инкапсулированных в липосомы. Результаты представлены на рис. 1–3.

После введения антибиотиков в свободной и липосомальной формах наблюдали снижение содержания клеток, экспрессирующих CD3<sup>+</sup>- и CD4<sup>+</sup>-рецепторы, на 1-е и 3-и сутки эксперимента (в некоторых случаях снижение носило стати-

стически не значимый характер) по сравнению с результатами, полученными у контрольной группы животных. К 5-м суткам у опытных животных наблюдалось восстановление показателя Т-лимфоцитов и Т-хелперов до контрольных значений, а в отдельных случаях – превышение их. При этом липосомальная форма способствовала минимальному отклонению Т-клеток от нормы после введения препаратов (не более 8%), тогда как свободные антибиотики приводили к снижению показателя до 20% (в частности азитромицин).

Из общих закономерностей оказываемого на популяцию В-лимфоцитов эффекта антибактериальных препаратов в свободной и липосомальной формах можно отметить (так

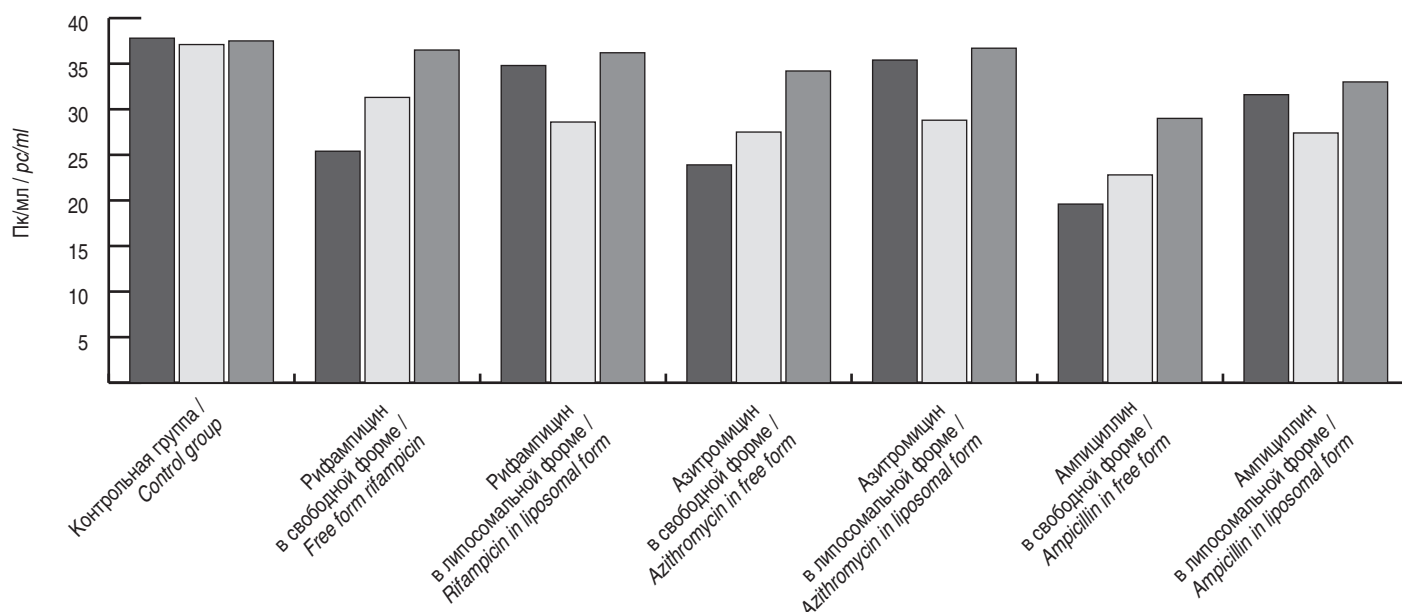


Рис. 5. Динамика показателя содержания ИЛ-6 при введении белым мышам антибиотиков в свободной и липосомальной формах: ■ – 1-е сутки, □ – 3-и сутки, ▒ – 5-е сутки.  
 Рис. 5. Dynamics of the IL-6 content when white mice are administered antibiotics in free and liposomal forms: ■ – 1 day, □ – 3 days, ▒ – 5 days.

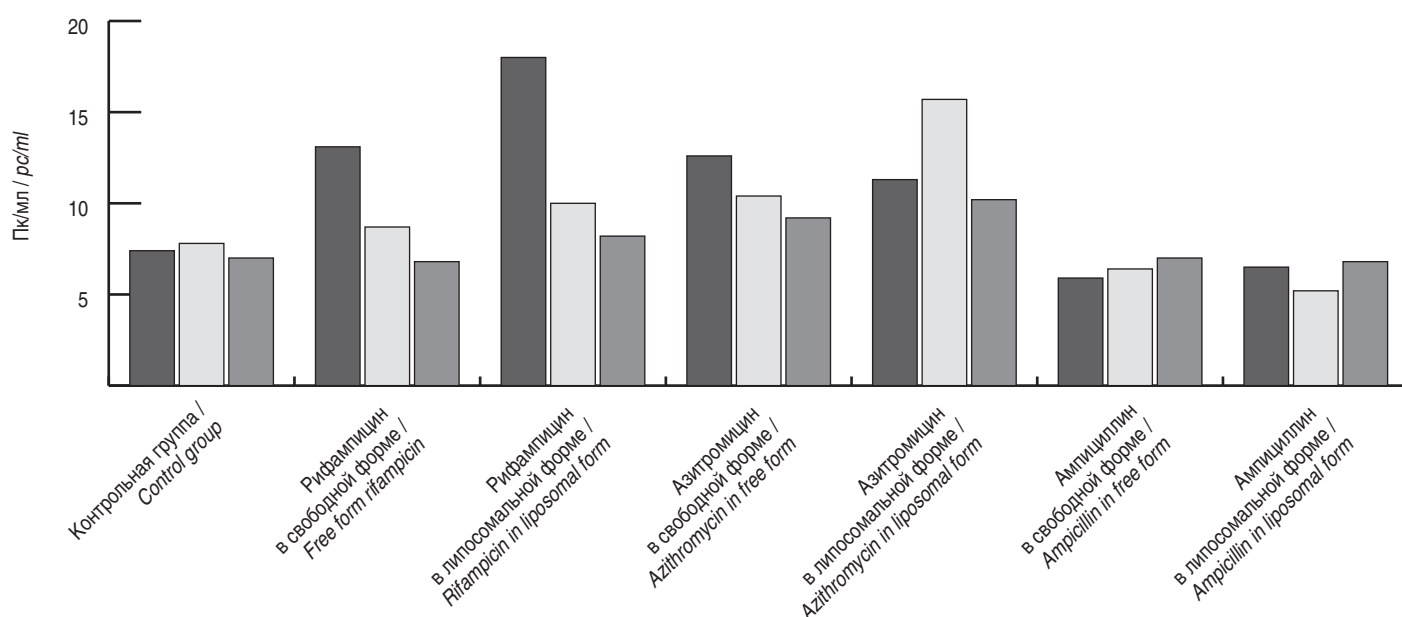


Рис. 6. Динамика показателя содержания ФНО-α при введении белым мышам антибиотиков в свободной и липосомальной формах: ■ – 1-е сутки, □ – 3-и сутки, ▒ – 5-е сутки.  
 Рис. 6. Dynamics of TNF-α content during administration of antibiotics in free and liposomal forms to white mice: ■ – 1 day, □ – 3 days, ▒ – 5 days.

же как и в случае с Т-клетками) наименьшие отклонения у опытных групп животных от показателей контроля на 5-е сутки эксперимента, т.е. к этому времени происходила нормализация соответствующих значений. В случае с рифампицином и азитромицином был получен разнонаправленный эффект при введении антибиотиков в свободной и липосомальной формах. Однако в целом можно констатировать менее значимое влияние инкапсулированных в липосомы препаратов на популяцию В-лимфоцитов в эксперименте по сравнению с интактной формой.

Следующей задачей было сравнительное изучение влияния свободной и липосомальной форм антибактериальных

препаратов на провоспалительные цитокины ИЛ-1β, ИЛ-6, ФНО-α, играющие важное значение для координации клеточно-опосредованного иммунного ответа, и противовоспалительный цитокин ИЛ-4, выполняющий регулируемую роль в специфических иммунных реакциях и ограничивающий развитие воспаления (рис. 4-7).

Изучение цитокинпродуцирующей активности клеток показало, что наибольшее влияние на выработку ИЛ-1β оказывал рифампицин, увеличивая ее в отдельные сроки эксперимента в 1,5–2 раза. Однако изменения концентрации этого пептида было разнонаправленным при введении препарата в свободной и липосомальной формах. Если

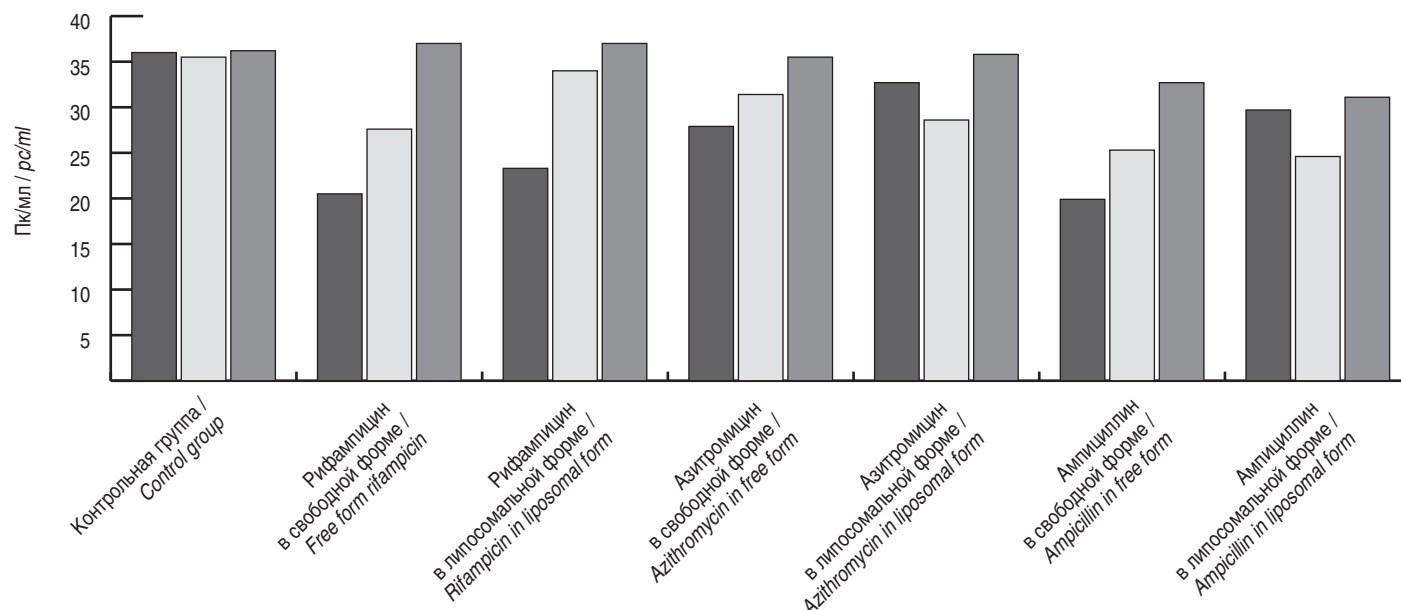


Рис. 7. Динамика показателя содержания ИЛ-4 при введении белым мышам антибиотиков в свободной и липосомальной формах: ■ – 1-е сутки, □ – 3-и сутки, ▒ – 5-е сутки.  
 Rice. 7. Dynamics of IL-4 content when white mice were administered antibiotics in free and liposomal forms: ■ – 1 day, □ – 3 days, ▒ – 5 days.

максимальный уровень секреции при введении интактного антибиотика наблюдался через 24 ч, приближаясь к 5-м суткам к контрольным значениям, то иммобилизованный в мембрану липосом рифампицин вызывал постепенное увеличение синтеза ИЛ-1 $\beta$ , достигая наибольших значений на 5-е сутки.

Азитромицин и ампициллин вызывали изменения в уровне секреции ИЛ-1 $\beta$  в пределах 30–40%. Единственный препарат, способствующий снижению выработки этого провоспалительного интерлейкина на 1-е и 5-е сутки эксперимента, – азитромицин в свободной форме.

Концентрация ИЛ-6, напротив, снижалась после введения антибиотиков. Липосомальная форма препаратов способствовала меньшему отклонению от нормальных значений через 24 ч после начала эксперимента. В дальнейшем наблюдалось постепенное восстановление показателя.

Рифампицин и азитромицин стимулировали повышенную выработку ФНО- $\alpha$ . Максимальные значения наблюдались при введении липосомальных форм – через 24 ч для рифампицина и на 3-и сутки эксперимента для азитромицина. В свою очередь, ампициллин вызывал незначительное снижение секреции этого цитокина. На 5-е сутки во всех случаях наблюдались значения наиболее близкие к контрольной группе животных.

Антибиотики способствовали угнетению секреции ИЛ-4 во все сроки исследования (в отдельных случаях изменения носили статистически незначимый характер). При этом к 5-м суткам уровень ИЛ-4 восстанавливался, приближаясь к контрольному. Сравнивая действия препаратов в свободной и липосомальной формах, можно отметить, что липосомы способствовали меньшему отклонению от нормы концентрации этого противовоспалительного цитокина (за исключением рифампицина на 3-и и 5-е сутки).

Таким образом, в ходе эксперимента антибактериальные препараты как в свободной, так и в липосомальной форме

оказывали существенное влияние на иммунный статус экспериментальных животных. При изучении популяции лимфоцитов установлено, что они способствовали сдвигу лимфоцитарной формулы в сторону уменьшения процентного содержания Т-лимфоцитов и их субпопуляции Т-хелперов, что может приводить к ослаблению клеточного иммунного ответа макроорганизма. Воздействие антибиотиков на цитокинпродуцирующую активность заключалось в повышении выработки провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$ , угнетении секреции ИЛ-6 и противовоспалительного ИЛ-4, что может способствовать нежелательным гипериммунным реакциям. Максимальные изменения фиксировались в 1-е сутки эксперимента, а к 5-м суткам значения приближались к норме. Однако включение антибиотиков в липосомы обеспечивало уменьшение вариативности секреторной функции клеток иммунной системы, таким образом позволяя ослабить влияние препаратов на показатели гомеостаза организма.

#### Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

#### Financial support

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

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

#### Литература

1. Бурдаев НИ, Николаева ЛЛ, Косенко ВВ, Шпрах ЗС, Бунятян НД. Липосомы как носители лекарственных средств: классификация, методы получения и применение. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского

- применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. 2023;13(2-1):316-332. DOI: 10.30895/1991-2919-2023-508
2. Almeida B, Nag OK, Rogers KE, Delehanty JB. Recent Progress in Bioconjugation Strategies for Liposome-Mediated Drug Delivery. *Molecules*. 2020 Dec 1;25(23):5672. DOI: 10.3390/molecules25235672
3. Andra VVSNL, Pammi SVN, Bhatraju LVKP, Ruddaraju LK. A Comprehensive Review on Novel Liposomal Methodologies, Commercial Formulations, Clinical Trials and Patents. *Bionanoscience*. 2022;12(1):274-291. DOI: 10.1007/s12668-022-00941-x
4. Krasnopol'skii YM, Grigoreva AS, Katsai O, Konakhovich NF, Prokhorov VV, Stadnichenko AV, et al. Technologies and perspectives of liposomal drug application in clinical practice. *Nanotechnologies in Russia*. 2017;12(7-8):461-70. DOI: 10.1134/S1995078017040139
5. Горбик ВС, Шпрах ЗС, Козлова ЖМ, Салова ВГ. Липосомы как система таргетной доставки лекарственных средств (обзор). *Российский биотерапевтический журнал*. 2021;20(1):33-41. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-1-33-41
6. Choudhury A, Ahmed FRS, Hossen MN, et al. Liposome: a carrier for effective drug delivery. *J of Applied Pharmaceutical Research*. 2020;8(1):22-28. DOI: 10.3923/pjbs.2006.1181.1191
7. Новикова АА, Кезимана П, Станишевский ЯМ. Методы получения липосом, используемых в качестве носителей лекарственных средств (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;19(2):134-138.
8. Sanarova E, Lantsova A, Oborotova N, Orlova O, Polozkova A, Dmitrieva M, et al. Liposome drug delivery. *J Pharm Sci & Res*. 2019;11(3):1148-55.
9. Shvets VI, Kaplun AP, Krasnopol'skii YM, Stepanov AE, Chekhonin VP. From liposomes of the 1970s to 21<sup>st</sup> century nanobiotechnology. *Nanotechnol Russia*. 2008;3:643-55. DOI: 10.1134/S1995078008110013
10. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett*. 2013;8(1):102. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102
11. Lamichhane N, Udayakumar TS, D'Souza WD, Simone CB, Raghavan SR, Polf J, et al. Liposomes: clinical applications and potential for image-guided drug delivery. *Molecules*. 2018;23(2):288. DOI: 10.3390/molecules23020288
12. Ефременко ДВ, Таран ТВ, Кочарян АС, Головинская ТМ, Кузнецова ИВ, Бабий АМ, и др. Изучение возможности направленной доставки липосомальных препаратов в органы и ткани макроорганизма. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2008;3(11):3-5.
13. Ефременко ДВ, Ефременко ВИ, Кузнецова ИВ, Таран ТВ, Ефременко АА, Коготкова ОИ. Распределение антибактериальных липосомальных препаратов в организме экспериментальных животных в зависимости от состава мембран наноконтейнеров. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2013;8(4):5-9. DOI: 10.14300/mnnc.2013.08028
14. Борздов АА, Логвиненко ОВ, Борздова ИЮ, Ефременко ВИ. Оценка иммуногенности интактных липосом по показателям гуморального и клеточного иммунитета. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2008;3:6-8.
15. Ефременко ВИ. Влияние интактных бионаноструктур-липосом на биохимический и иммунологический статус организма. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015;92(5):80-88.
16. Ефременко ДВ, Борздов АА, Борздова ИЮ, Кочарян АС, Логвиненко ОВ. Влияние липосом – потенциальных транспортеров лекарственных препаратов на морфологические и иммунологические показатели у экспериментальных животных. *Вестник Российской военно-мед. академии*. 2008;2(22), приложение:154-155.
17. Ефременко ВИ, Оверченко ВВ, Мисетова ЕН, и др. Способ получения комплекса фосфолипидов. Патент РФ №2192265 от 10.11.2002.
18. Таран ТВ. Биотехнология получения лекарственных и иммуногенных липосомальных композиций, используемых в лечении особо опасных инфекций и получении сырья для производства медицинских иммунобиологических препаратов. Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. Ставрополь, 2009.
19. Ефременко ВИ. Липосомы (получение, свойства, аспекты применения в биологии и медицине). М-во здравоохранения РФ. Ставроп. науч.-исслед. противочум. ин-т. Ставрополь, 1999.
20. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сеп, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.
21. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований. Под ред. Лабинской АС, Блинковой ЛП. СПб.: Лань, 2021.
22. Кишкун АА. Иммунологические исследования и методы диагностики инфекционных заболеваний в клинической практике. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2009.

## References

1. Burdaev NI, Nikolaeva LL, Kosenko VV, Shprakh ZS, Bunyatyan ND. Liposomes as drug carriers: classification, preparation methods, and medicinal use. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(2-1):316-332. DOI: 10.30895/1991-2919-2023-508 (In Russian).
2. Almeida B, Nag OK, Rogers KE, Delehanty JB. Recent Progress in Bioconjugation Strategies for Liposome-Mediated Drug Delivery. *Molecules*. 2020 Dec 1;25(23):5672. DOI: 10.3390/molecules25235672
3. Andra VVSNL, Pammi SVN, Bhatraju LVKP, Ruddaraju LK. A Comprehensive Review on Novel Liposomal Methodologies, Commercial Formulations, Clinical Trials and Patents. *Bionanoscience*. 2022;12(1):274-291. DOI: 10.1007/s12668-022-00941-x
4. Krasnopol'skii YM, Grigoreva AS, Katsai O, Konakhovich NF, Prokhorov VV, Stadnichenko AV, et al. Technologies and perspectives of liposomal drug application in clinical practice. *Nanotechnologies in Russia*. 2017;12(7-8):461-70. DOI: 10.1134/S1995078017040139
5. Горбик ВС, Шпрах ЗС, Козлова ЖМ, Салова ВГ. Липосомы как система таргетной доставки лекарственных средств (обзор). *Российский биотерапевтический журнал*. 2021;20(1):33-41. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-1-33-41 (In Russian).
6. Choudhury A, Ahmed FRS, Hossen MN, et al. Liposome: a carrier for effective drug delivery. *J of Applied Pharmaceutical Research*. 2020;8(1):22-28. DOI: 10.3923/pjbs.2006.1181.1191
7. Novikova AA, Kezimana P, Stanishevskiy YaM. Methods of obtaining liposomes, used as drug delivery systems (review). *Drug Development & Registration*. 2017;19(2):134-138. (In Russian).
8. Sanarova E, Lantsova A, Oborotova N, Orlova O, Polozkova A, Dmitrieva M, et al. Liposome drug delivery. *J Pharm Sci & Res*. 2019;11(3):1148-55.
9. Shvets VI, Kaplun AP, Krasnopol'skii YM, Stepanov AE, Chekhonin VP. From liposomes of the 1970s to 21<sup>st</sup> century nanobiotechnology. *Nanotechnol Russia*. 2008;3:643-55. DOI: 10.1134/S1995078008110013
10. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett*. 2013;8(1):102. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102
11. Lamichhane N, Udayakumar TS, D'Souza WD, Simone CB, Raghavan SR, Polf J, et al. Liposomes: clinical applications and potential for image-guided drug delivery. *Molecules*. 2018;23(2):288. DOI: 10.3390/molecules23020288
12. Efremenko DV, Taran TV, Kocharyan AS, Golovinskaya TM, Kuznetsova IV, Babiy AM, et al. Study of the possibility of targeted delivery of liposomal drugs to organs and tissues of the macro-organism. *Medical News of The North Caucasus*. 2008;3(11):3-5. (In Russian).
13. Efremenko DV, Efremenko VI, Kuznetsova IV, Taran TV, Efremenko AA, Kogotkova OI. Distribution of liposomal forms of antibiotics in laboratory animals depending on the composition of membranes of nanocontainers. *Medical News of The North Caucasus*. 2013;8(4):5-9. DOI: 10.14300/mnnc.2013.08028 (In Russian).

14. Borzdov AA, Logvinenko OV, Borzdova IYu, Efremenko VI. Evaluation of immunogenicity of intact liposomes by humoral and cellular immunity. *Medical News of The North Caucasus*. 2008;3:6-8. (In Russian).
15. Efremenko VI. Effect of intact bionanostructures-liposomes on the biochemical and immunological status of the organism. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2015;92(5):80-88. (In Russian).
16. Efremenko DV, Borzdov AA, Borzdova IYu, Kocheryan AS, Logvinenko OV. Effect of liposomes – potential drug transporters on morphological and immunological parameters in experimental animals. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2008;2(22), prilozhenie:154-155. (In Russian).
17. Efremenko VI, Overchenko VV, Misetova EN, et al. Method for producing a phospholipid complex. Patent RF No. 2192265, 10.11.2002. (In Russian).
18. Taran TV. Biotechnology for the preparation of medicinal and immunogenic liposomal compositions used in the treatment of especially dangerous infections and the production of raw materials for the production of medical immunobiological preparations. *Avtoref. diss. ... dokt. med. nauk. Stavropol'*, 2009. (In Russian).
19. Efremenko VI. Liposomes (Preparation, properties, aspects of application in biology and medicine). *M-vo zdravookhraneniya RF. Stavrop. nauch.-issled. protivochum. in-t. Stavropol'*, 1999. (In Russian).
20. Determination of the sensitivity of pathogens of dangerous bacterial infections (plague, anthrax, cholera, tularemia, brucellosis, melioidosis) to antibacterial drugs: Guidelines. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rosпотребнадзор, 2010. (In Russian).
21. General and sanitary microbiology with microbiological research technique. Labinskoy AS, Blinkovoy LP. Saint-Petersburg: Lan' Publ., 2021. (In Russian).
22. Kishkun AA. Immunological research and methods for diagnosing infectious diseases in clinical practice. M.: OOO «Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo», 2009. (In Russian).

**Информация о соавторах:**

Базиков Игорь Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии ФБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»

Ефременко Дмитрий Витальевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории эпидемиологии ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Логвиненко Ольга Васильевна, кандидат биологических наук, заведующая сектором иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Ракитина Екатерина Львовна, кандидат медицинских наук, врач клинической лабораторной диагностики, сектор иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Базиков Филипп Игоревич, аспирант кафедры микробиологии ФБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»

Ефременко Виталий Иванович, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории подготовки специалистов ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

**Information about co-authors:**

Igor A. Bazikov, MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Microbiology, Stavropol State Medical University

Dmitry V. Efremenko, PhD, MD, leading researcher at the Laboratory of Epidemiology, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rosпотребнадzor

Olga V. Logvinenko, PhD in Biological Sciences, Head of the Sector of Immunology and Pathomorphology of Particularly Dangerous Infectious Diseases, Laboratory of Brucellosis, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rosпотребнадzor

Ekaterina L. Rakitina, PhD, MD, Clinical Laboratory Diagnostics Doctor, Sector of Immunology and Pathomorphology of Particularly Dangerous Infectious Diseases, Brucellosis Laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rosпотребнадzor

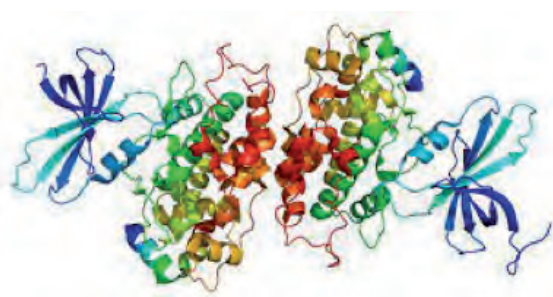
Philipp I. Bazikov, graduate student of the Department of Microbiology, Stavropol State Medical University

Vitaly I. Efremenko, MD, PhD, DSc, Professor, Chief Researcher of the Specialist Training Laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rosпотребнадzor

**НОВОСТИ НАУКИ**

**Соединение, которое обещает остановить инфекции**

Исследователи идентифицировали соединение, которое на первых порах обещает остановить инфекции, вызванные целым рядом коронавируса, включая все варианты SARS-CoV-2 и простуду. Их тестирование дало несколько ингибиторов GSK3, которые показали высокий уровень эффективности против коронавируса и низкую токсичность для клеток человека. Ведущее соединение, идентифицированное как T-1686568, ингибировало как SARS-CoV-2, так и вирус простуды, основные критерии, которые авторы использовали при поиске защиты широкого спектра действия. Полученные данные открывают потенциальный путь к противовирусному лечению, которое можно было бы использовать против многих различных патогенов.



Shapira T., et al.

*Inhibition of glycogen synthase kinase-3-beta (GSK3β) blocks nucleocapsid phosphorylation and SARS-CoV-2 replication. Molecular Biomedicine. 2022;1(3):43.*

# Исследования микробиоты кишечника у обезьян разного возраста

В.И.Полякова, И.М.Аршба

Курчатовский комплекс медицинской приматологии ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»,  
Сочи, Российская Федерация

Изучение микробиоты толстого кишечника макак резусов является важным этапом подготовки для последующего моделирования воспалительных заболеваний кишечника и эффектов трансплантации фекальной микробиоты путем оценки состояния микробиоценоза толстого кишечника, выявления дисбиотических нарушений и отдельных клинически значимых патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, среди которых присутствуют некультивируемые облигатные анаэробы. Результаты исследования методом полимеразной цепной реакции в реальном времени показали, что нет существенных количественных различий в микробиоте толстого кишечника клинически здоровых макак резусов в разных возрастных группах. Представители нормальной микробиоты кишечника доминируют во всех возрастных группах. Выявлены условно-патогенные микроорганизмы, патогенные микроорганизмы отсутствуют. Среди некультивируемых анаэробов выявлены микроорганизмы – генетические маркеры состояния микробиоты кишечника у человека: *Akkermansia muciniphila*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*, а также *Faecalibacterium prausnitzii*, обладающие противовоспалительными свойствами. Микробиота кишечника обезьян, обладая высоким сходством с микробиотой человека, позволяет использовать данных лабораторных животных как объект для безопасного и эффективного проведения трансплантации фекальной микробиоты.

**Ключевые слова:** обезьяны, макак резус, микробиота кишечника, биологическая модель, Колонофлор-16

**Для цитирования:** Полякова В.И., Аршба И.М. Исследования микробиоты кишечника у обезьян разного возраста. Бактериология. 2024; 9(1): 46–51. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-46-51

## Studies of gut microbiota in monkeys of different ages

V.I.Polyakova, I.M.Arshba

Kurchatov complex of medical primatology of FSBI NRC “Kurchatov Institute”, Sochi, Russian Federation

The study of the microbiota of the large intestine of rhesus macaques is an important stage of preparation for subsequent modeling of inflammatory bowel diseases and the effects of fecal microbiota transplantation, by assessing the state of the microbiocenosis of the large intestine, identifying dysbiotic disorders and certain clinically significant pathogenic and opportunistic microorganisms, including unculturable obligate anaerobes. The results of a real-time PCR study showed that there are no significant quantitative differences in the colon microbiota of clinically healthy rhesus macaques in different age groups. Representatives of the normal gut microbiota dominate in all age groups. Opportunistic microorganisms were identified, pathogenic microorganisms were absent. Among uncultivable anaerobes, microorganisms were identified – genetic markers of the state of the human intestinal microbiota: *Akkermansia muciniphila*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*, as well as *Faecalibacterium prausnitzii*, which have anti-inflammatory properties. The gut microbiota of monkeys, being highly similar to the human microbiota, makes it possible to use these laboratory animals as an object for safe and effective fecal microbiota transplantation.

**Key words:** monkeys, rhesus monkeys, gut microbiota, biological model, Colonoflor-16

**For citation:** Polyakova V.I., Arshba I.M. Studies of gut microbiota in monkeys of different ages. Bacteriology. 2024; 9(1): 46–51. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-46-51

**З**начительный прогресс в области изучения кишечной микробиоты основан на следующих методах молекулярной биологии: полимеразная цепная реакция (ПЦР), полногеномное секвенирование и секвенирование генов с использованием консервативной 16S рРНК. Эти исследования раскрыли перспективы для обнаружения некультивируемых бактерий и уже сегодня значительно продвинули знания

о кишечном микробиоме (бактерии и их геном), а также выявили значимые ассоциации между присутствием определенных групп/видов микроорганизмов и наличием патологии [1–3].

В настоящее время в лечении ряда заболеваний проводятся попытки применения метода трансплантации фекальной микробиоты (ТФМ). Вследствие филогенетического

### Для корреспонденции:

Полякова Вероника Игоревна, младший научный сотрудник лаборатории инфекционной патологии ФГБУ «Курчатовский комплекс медицинской приматологии» НИЦ «Курчатовский институт»

Адрес: 354376, г.о. Сочи, с. Весёлое, ул. Мира, 177, к.1

Статья поступила 30.11.2023, принята к печати 29.03.2024

### For correspondence:

Veronika I. Polyakova, Junior researcher, Laboratory of Infectious Pathology, FSBI Kurchatov complex of medical primatology of NRC “Kurchatov Institute”

Address: 177k1 Mira str., Vesolyoye village, Sochi urban district, Krasnodar region, 354376, Russian Federation

The article was received 30.11.2023, accepted for publication 29.03.2024

родства обезьяны являются незаменимой экспериментальной моделью для испытания эффективности и безопасности вакцин, биопрепаратов, новых лекарственных средств и воспроизведения различных патологических состояний человека. Микробиота кишечника обезьян обладает высоким сходством с микробиотой человека, модулирует метаболизм хозяина, особенности иммунного ответа и является индикатором состояния макроорганизма. Проведение медико-биологических исследований, особенно в области воспроизведения моделей заболевания желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), требует уточнения информации о вариативности микробиоты кишечника обезьян с привлечением данных генетического и метагеномного анализа. В качестве эталона для исследований микробиоты кишечника используются обезьяны вида макак резус [4].

**Цель работы:** изучение особенностей микробиоты толстого кишечника макак резусов в четырех возрастных группах для последующего моделирования воспалительных заболеваний кишечника и эффектов трансплантации фекальной микробиоты.

### Материалы и методы

Исследование по определению количественного состава микробиоты толстого кишечника проводилось на 48 клинически здоровых макаках резусах в четырех возрастных группах, содержащихся в Курчатовском комплексе медицинской приматологии НИЦ «Курчатовский институт» (табл. 1).

Разделение на 4 возрастные группы было обусловлено влиянием различных факторов на микробиоту кишечника. В течение первого года жизни ведущим фактором в формировании микробиоты кишечника обезьян можно считать грудное или искусственное вскармливание; введение прикорма и постепенный переход к сбалансированному питанию, аналогичному для взрослых особей (гранулированный корм из продуктов растительного и животного происхождения, дополненный минеральными солями и витаминами). Дополнительно к гранулированному корму добавляют сочный корм (зелень, овощи, фрукты), также в рацион входят хлеб и яйца, что существенно сказывается на микробиоте подростков животных 1–3 лет. Молодые особи заслуживают внимания ввиду запуска активных процессов роста и полового созревания. У старых особей происходят значительные изменения в работе ЖКТ в связи с физиологическим старением организма.

Обезьяны находились в специальном помещении для содержания животных в индивидуальных клетках, оборудован-

ных кормушками и автоматическими поилками. Под каждой клеткой были установлены металлические поддоны для сбора фекальных образцов.

Сбор материала (фекальных образцов) проводили по утрам, после уборки помещений и мытья поддонов. Материал в стерильных контейнерах доставляли в лабораторию для дальнейшего исследования.

*Предварительную обработку фекальных образцов* проводили в соответствии с методическими указаниями «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» МУ 1.3.2569-09, Москва, 2009.

#### *Приготовление фекальной суспензии*

В микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл вносили 0,8 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида. В каждую пробирку отдельным наконечником с фильтром или одноразовыми лопатками вносили 0,1 г фекалий и тщательно ресуспендировали на вортексе до образования гомогенной суспензии.

*Приготовление бактериальной фракции фекалий для выявления бактериальных агентов*

Для приготовления бактериальной фракции фекалий использовали свежеприготовленную суспензию фекалий. Пробирки с суспензией (водянистыми фекалиями) центрифугировали при 12000 g в течение 5 мин на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия). Отдельным наконечником с фильтром из каждой пробирки отбирали бактериальную фракцию в объеме 0,1 мл (верхняя бело-желтая часть образовавшегося осадка). Отобранную часть пробы, содержащую высокую концентрацию бактерий, переносили в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл. Хранили при температуре -20°C в течение недели и при температуре -70°C длительно [5].

*Выделение тотальной ДНК из фекальных образцов* проводили при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» в соответствии с инструкцией (AmpliSens, ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора).

Бактериальное разнообразие кишечной микробиоты устанавливали методом ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с применением набора реагентов «Колонофлор-16 (биоценоз)» (ООО «АльфаЛаб», Россия) на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories Inc., США).

Статистическую обработку данных и расчеты осуществляли при помощи программы GraphPad Prism 8.

Для оценки достоверности различий по частоте обнаружения разных типов дисбиоза/микроорганизмов в отдельных возрастных группах использовали критерий  $\chi^2$ . Все различия интерпретировали как достоверные при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

Исследования показали, что представители нормальной микробиоты толстого кишечника человека – *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Escherichia coli* и *Bacteroides* spp. – характеризуются высокой частотой обнаружения во всех возрастных группах (табл. 2). *Enterococcus* spp. встречается со статически значимой частотой – 91,7% случаев у подростков, данный показатель намного выше, чем у детены-

	Группа I / Group I	Группа II / Group II	Группа III / Group III	Группа IV / Group IV
Возраст / Age	детеныши (до 1 года) / Cubs (up to 1 year)	подростки (1–3 года) / teenagers (1–3 years)	молодые особи (от 4 до 7 лет) / young animals (4–7 years)	старые особи (17–26 лет) / old animals (17–26 years)
Кол-во / Quantity	12	12	12	12



Таблица 2. Частота обнаружения представителей нормальной микрофлоры кишечника человека в четырех возрастных группах макак резусов

Table 2. Frequency of detection of representatives of normal human intestinal microflora in four age groups of rhesus macaques

Вид микроорганизмов / Type of microorganisms	Группа I / Group I	Группа II / Group II	Группа III / Group III	Группа IV / Group IV	p*	Всего (n = 48)
<i>Lactobacillus</i> spp.	100%	100%	100%	100%	-	100%
<i>Bifidobacterium</i> spp.	100%	100%	100%	100%	-	100%
<i>Escherichia coli</i>	100%	100%	100%	100%	-	100%
<i>Bacteroides</i> spp.	100%	100%	91,7%	100%	0,3819	97,9%
<i>Enterococcus</i> spp.	25%	91,7%	33,3%	25%	0,0017	43,75%

\*p < 0,05, критерий  $\chi^2$  (достоверность различий по частоте обнаружения микроорганизмов в отдельных возрастных группах).  
 \*p < 0.05,  $\chi^2$  test (significance of differences in the frequency of detection of microorganisms in individual age groups).

Таблица 3. Частота обнаружения условно-патогенных микроорганизмов микрофлоры кишечника человека в четырех возрастных группах макак резусов (>10<sup>4</sup> копий/мл)

Table 3. Frequency of detection of opportunistic microorganisms of human intestinal microflora in four age groups of rhesus monkeys (>10<sup>4</sup> copies/ml)

Вид микроорганизмов / Type of microorganisms	Группа I / Group I	Группа II / Group II	Группа III / Group III	Группа IV / Group IV	p*	Всего (n = 48)
<i>Klebsiella</i> spp.	25%	25%	25%	25%	>0,9999	25%
<i>Citrobacter</i> spp.	33,3%	16,6%	16,6%	-	0,1870	16,6%
<i>Enterobacter</i> spp.	75%	41,6%	8,3%	41,6%	0,0119	41,6%
<i>Proteus vulgaris/mirabilis</i>	25%	33,3%	33,3%	33,3%	0,9617	31,25%
<i>Staphylococcus aureus</i>	66,6%	66,6%	33,3%	75%	0,1618	60,4%
<i>Candida</i> spp.	8,3%	8,3%	8,3%	8,3%	>0,9999	8,3%

\*p < 0,05, критерий  $\chi^2$  (достоверность различий по частоте обнаружения микроорганизмов в отдельных возрастных группах).  
 \*p < 0.05,  $\chi^2$  test (significance of differences in the frequency of detection of microorganisms in individual age groups).

Таблица 4. Частота обнаружения анаэробных микроорганизмов микрофлоры кишечника человека в четырех возрастных группах макак резусов

Table 4. Frequency of detection of anaerobic microorganisms of the human intestinal microflora in four age groups of rhesus macaques

Вид микроорганизмов / Type of microorganisms	Группа I / Group I	Группа II / Group II	Группа III / Group III	Группа IV / Group IV	p*	Всего (n = 48)
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	100%	100%	100%	100%	-	100%
<i>Bacteroides thetaomicon</i>	-	-	8,3%	16,6%	0,2712	6,25%
<i>Akkermansia muciniphila</i>	-	8,3%	8,3%	41,6%	0,0197	14,6%
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	25%	16,6%	33,3%	33,3%	0,7625	27,1%
<i>Parvimonas micra</i>	58,3%	66,6%	25%	58,3%	0,1774	43,75%
<i>Clostridium difficile</i>	16,6%	16,6%	25%	16,6%	0,9381	18,75%
<i>Clostridium perfringens</i>	33,3%	33,3%	33,3%	33,3%	>0,9999	33,3%

\*p < 0,05, критерий  $\chi^2$  (достоверность различий по частоте обнаружения микроорганизмов в отдельных возрастных группах).  
 \*p < 0.05,  $\chi^2$  test (significance of differences in the frequency of detection of microorganisms in individual age groups).

шей до года (25%). Это связано с тем, что заселение микрофлоры происходит более активно у детей на естественном вскармливании, а обследуемые детеныши находятся на искусственном [4]. Энтерококки играют иммуностимулирующую роль в микробиоте кишечника, снижение частоты обнаружения энтерококков у молодых и старых особей свидетельствует о дисбиозе.

Среди условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) обнаружены *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Clostridium difficile* и *Clostridium perfringens*, а также дрожжеподобные грибы рода *Candida*, которые являются этиологическим фактором развития воспалительных заболеваний кишечника, а также индикатором иммунодефицитных состояний (табл. 3).

Род *Klebsiella* был выявлен с одинаковой частотой (25%) во всех возрастных группах. При дисбиозе у людей часто наблюдаются ассоциации клебсиелл с другими микроорганизмами [6, 7, 8], такими как *Staphylococcus aureus* с высокой частотой обнаружения в группах I, II и IV, реже – с грибами рода *Candida*, частота обнаружения которых составила 8,3% во всех группах.

Микробы рода *Citrobacter* у детенышей до года встречаются чаще (33,3%), чем у подростков и молодых особей (16,6%). Микробы рода *Enterobacter* характеризуется статистически значимой частотой обнаружения у детенышей – 75%. Данные виды микроорганизмов часто являются причиной острого гастроэнтерита у детей и подростков [8]. *Proteus* spp., наоборот, встречается реже у детенышей

Таблица 5. Частота выявления нормального соотношения микробиоты и дисбиозов кишечника у обследованных макак резусов  
 Table 5. Frequency of detection of a normal ratio of microbiota and intestinal dysbiosis in the examined rhesus macaques

Тип дисбиоза / Type of dysbiosis	Группа I / Group I	Группа II / Group II	Группа III / Group III	Группа IV / Group IV	<i>p</i> *	Всего ( <i>n</i> = 48)
Норма / Norm	-	-	-	8,3%	0,3819	2,1%
Увеличение числа УПМ** / Increasing the number of UPM	91,7%	91,7 %	50%	75%	0,0481	77,1%
Снижение содержания лактобактерий без увеличения числа УПМ / Reducing the content of lactobacilli without increasing the number of UPM	-	-	8,3%	-	0,3819	2,1%
Снижение содержания лактобактерий с увеличением числа УПМ / Decrease in the content of lactobacilli with an increase in the number of UPM	8,3%	8,3%	33,3%	8,3%	0,2109	14,6%
Снижение содержания бифидобактерий и лактобактерий / Reduced content of bifidobacteria and lactobacilli	-	-	8,3%	-	0,3819	2,1%
Анаэробный дисбаланс без увеличения числа УПМ / Anaerobic imbalance without increasing the number of UPM	-	-	-	-	-	-
Анаэробный дисбаланс с ростом числа УПМ / Anaerobic imbalance with increasing number of UPM	-	-	-	8,3%	0,3819	2,1%

\**p* < 0,05, критерий  $\chi^2$  (достоверность различий по частоте обнаружения разных типов дисбиоза в отдельных возрастных группах);  
 \*\*УПМ – уропатогенные микроорганизмы.  
 \**p* < 0.05,  $\chi^2$  test (significance of differences in the frequency of detection of different types of dysbiosis in individual age groups);  
 \*\*UPM – uropathogenic microorganisms.

(25%), чем во всех остальных группах с частотой обнаружения 33,3%.

В табл. 4 представлены анаэробные микроорганизмы, некоторые из которых являются генетическими маркерами состояния микробиоты кишечника у человека.

Анаэробные грамположительные кокки *Akkermansia muciniphila*, которые, регулируя проницаемость стенки кишечника и взаимодействуя с соседними клетками, нормализуют метаболизм, препятствуют ожирению и развитию сахарного диабета у людей [9], обнаружены лишь в 8,3% случаев у подростков и молодых обезьян, в отличие от старых особей (41,6%) со статистически значимой частотой.

*Fusobacterium nucleatum*, рост которых коррелирует с развитием колоректального рака у людей [10–12], чаще встречается у молодых и старых особей (33,3%). *Parvimonas micra*, ранний маркер канцерогенеза толстого кишечника у людей [9, 13], чаще встречается в группе II (66,6%).

Существуют бактерии с противоположным действием. Продуценты короткоцепочечной жирной кислоты бутирата – *Faecalibacterium prausnitzii*, обладающие противовоспалительными свойствами [14, 15], а также являющиеся хорошо известными продуцентами бактериоцинов [16], – выявлены у во всех животных во всех возрастных группах обезьян.

*Bacteroides thetaomicon*, входящие в особую группу *Bacteroides fragilis*, являются представителями нормальной микробиоты ЖКТ у людей [17], обладают противовоспалительными свойствами, которые способствуют усилению барьерной функции слизистой оболочки кишечника и ограничению инвазии патогенных микроорганизмов [18–20], и характеризуются невысокой частотой обнаружения в группе III и IV.

Как показывают проведенные ранее исследования, анаэробные спорообразующие палочки рода *Clostridium* являются представителями микробиоты толстого кишечника у обезьян [21]. *Clostridium perfringens* обнаружены во всех возрастных группах с частотой 33,3%. Выявление *Clostridium difficile* при отсутствии клинической симптоматики рассматривается как носительство [8].

Используемая тест-система «Колонофлор-16 (биоценоз)» позволяет автоматически сформировать заключение по количественному составу микроорганизмов и определить следующие состояния и клинически значимые изменения в микробиоте толстой кишки [22]:

1) отсутствие нарушений в составе микробиоты толстой кишки (соответствие количества выявляемых представителей нормальной микробиоты референтным значениям, заявленным в тест-системе «Колонофлор-16 (биоценоз)», выявление УПМ в допустимых значениях и отсутствие патогенных микроорганизмов);

2) снижение содержания облигатных представителей микробиоценоза (бифидобактерий и/или лактобактерий) без увеличения количества сапрофитной или условно-патогенной микрофлоры;

3) снижение содержания бифидобактерий, сочетающееся с выраженными изменениями в аэробной микрофлоре – снижением лактобактерий, появлением энтеропатогенных форм кишечной палочки, обнаружением одного или нескольких представителей патогенных микроорганизмов в высоких титрах;

4) обнаружение в фекальных образцах в диагностически значимых количествах (>10<sup>4</sup>), грибов рода *Candida* и условно-патогенных бактерий (*Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *S. aureus*, *C. difficile*, *C. perfringens*);

5) значительное снижение числа *F. prausnitzii* и, соответственно, изменение количественного соотношения *B. fragilis* / *F. prausnitzii* (анаэробный дисбаланс) (табл. 5).

Самым распространенным, статистически значимым типом дисбиоза во всех возрастных группах является рост УПМ и грибов рода *Candida* в диагностически значимых количествах (>10<sup>4</sup>).

В группах I и II частота увеличения числа УПМ составила 91,7%.

В группе III самой частой формой дисбиоза является увеличение числа УПМ (50%), а также снижение количества лактобактерий с увеличением числа УПМ (33,3%).

В группе 4, помимо увеличения числа УПМ (75%), также было обнаружено увеличение числа УПМ, включавшее снижение количества лактобактерий (8,3%) или анаэробный дисбаланс (8,3%).

## Выводы

1. Результаты исследования показали, что нет существенных количественных различий в микробиоте толстого кишечника клинически здоровых макак резусов в разных возрастных группах.

2. Представители анаэробной и факультативно-анаэробной нормальной микробиоты кишечника доминируют во всех возрастных группах, что является одним из ключевых факторов полноценного и адекватного становления иммунитета.

3. Самым распространенным типом дисбиоза является рост УПМ. Частота обнаружения некоторых видов достигает 75%, что на фоне снижения иммунитета у обезьян потенциально может представлять угрозу возникновения различных патологических процессов в кишечнике.

4. Патогенные микроорганизмы не обнаружены.

5. Среди некультивируемых анаэробов выявлены микроорганизмы – генетические маркеры состояния микробиоты кишечника у человека (*A. muciniphila*, *Parvimonas micra*, *F. nucleatum*).

6. *F. prausnitzii* – доминирующий вид бактерий у человека среди некультивируемых анаэробов. Также выявлен у макак резусов, высокая частота обнаружения указывает на отсутствие нарушений состояния местного иммунитета кишечника.

7. Микробиота кишечника обезьян, обладая высоким сходством с микробиотой человека, позволяет использовать данных лабораторных животных как объект для безопасного и эффективного проведения трансплантации фекальной микробиоты.

## Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

## Financial support

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

## Конфликт интересов

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

## Conflict of interest

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

## Литература

1. Loftus M, Hassounah SA, Yooseph S. Bacterial community structure alterations within the colorectal cancer gut microbiome. BMC Microbiol. 2021 Mar 31;21(1):98. DOI: 10.1186/s12866-021-02153-x  
2. Tang MS, Poles J, Leung JM, Wolff MJ, Davenport M, Lee SC, et al. Inferred metagenomic comparison of mucosal and fecal microbiota from individuals undergoing routine screening colonoscopy reveals similar differences observed

during active inflammation. Gut Microbes. 2015;6(1):48-56. DOI: 10.1080/19490976.2014.1000080  
3. Zhang YJ, Li S, Gan RY, Zhou T, Xu DP, Li HB. Impacts of gut bacteria on human health and diseases. Int J Mol Sci. 2015 Apr 2;16(4):7493-519. DOI: 10.3390/ijms16047493  
4. Иммунобиологические препараты и перспективы их применения в инфектологии. Под ред. Онищенко ГГ, Алёшкина ВА, Афанасьева СС, Поспеловой ВВ. М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2002.  
5. МУ 1.3.2569-09 Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности.  
6. Бондаренко ВМ, Мацулевич ТВ. Дисбактериоз кишечника как клиничко-лабораторный синдром: современное состояние проблемы. М.: ГЭОТАР-медиа, 2007.  
7. Отраслевой стандарт ОСТ 91500.11.0004-12. 2003. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника. Утв. 09.06.03.  
8. Приложение к инструкции набора реагентов для исследования микробиоты толстого кишечника методом полимеразой цепной реакции с флуоресцентной детекцией в реальном времени «КОЛОНОФЛОП-16 (биоценоз), (ООО «АЛЬФАЛАБ»)).  
9. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Атлас руководства: Учебное пособие. Под ред. Быкова АС, Зверева ВВ. М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2018.  
10. McCoy AN, Araújo-Pérez F, Azcárate-Peril A, Yeh JJ, Sandler RS, Keku TO. *Fusobacterium* is associated with colorectal adenomas. PLoS One. 2013;8(1):e53653. DOI: 10.1371/journal.pone.0053653  
11. Brennan CA, Garrett WS. *Fusobacterium nucleatum* – symbiont, opportunist and oncobacterium. Nat Rev Microbiol. 2019 Mar;17(3):156-166. DOI: 10.1038/s41579-018-0129-6  
12. Zhang X, Zhu X, Cao Y, Fang JY, Hong J, Chen H. Fecal *Fusobacterium nucleatum* for the diagnosis of colorectal tumor: A systematic review and meta-analysis. Cancer Med. 2019 Feb;8(2):480-491. DOI: 10.1002/cam4.1850  
13. Osman MA, Neoh H-M, Ab Mutalib N-S, Chin SF, Mazlan L, Ali RAR, et al. *Parvimonas micra*, *Peptostreptococcus stomatis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Akkermansia muciniphila* as a four-bacteria biomarker panel of colorectal cancer. Sci Rep. 2021 Feb 3;11(1):2925. DOI: 10.1038/s41598-021-82465-0  
14. Guo S, Li L, Xu B, Li M, Zeng Q, Xiao H, et al. A Simple and Novel Fecal Biomarker for Colorectal Cancer: Ratio of *Fusobacterium nucleatum* to Probiotics Populations, Based on Their Antagonistic Effect. Clin Chem. 2018 Sep;64(9):1327-1337. DOI: 10.1373/clinchem.2018.289728  
15. Lopez-Siles M, Duncan SH, Garcia-Gil LJ, Martinez-Medina M. *Faecalibacterium prausnitzii*: from microbiology to diagnostics and prognostics. ISME J. 2017 Apr;11(4):841-852. DOI: 10.1038/ismej.2016.176  
16. Zagato E, Pozzi C, Bertocchi A, Schioppa T, Saccheri F, Guglietta S, et al. Endogenous murine microbiota member *Faecalibaculum rodentium* and its human homologue protect from intestinal tumour growth. Nat Microbiol. 2020 Mar;5(3):511-524. DOI: 10.1038/s41564-019-0649-5  
17. Литусов НВ. Род *Bacteroides*. Иллюстрированное учебное пособие. Екатеринбург: ФГБОУ ВО УГМУ, 2017.  
18. Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. Science. 2001 Feb 2;291(5505):881-4. DOI: 10.1126/science.291.5505.881  
19. Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AG, et al. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. Nat Immunol. 2004 Jan;5(1):104-12. DOI: 10.1038/ni1018  
20. Wrzosek L, Miquel S, Noordine ML, Bouet S, Joncquel Chevalier-Curt M, Robert V, et al. *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic

- epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biol.* 2013 May 21;11:61. DOI: 10.1186/1741-7007-11-61
21. Стасилевич ЗК, Джикидзе ЭК, Калашникова ВА, Султанова ОА. Изучение роли анаэробных бактерий в кишечной патологии обезьян. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013;156(8):215.
22. Проценко ДА, Зорников ДЛ, Ворошилина ЕС. Результаты оценки микробиоты кишечника людей разных возрастных групп с использованием ПЦР-системы «Колонофлор-16». Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения. Материалы VII Международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов. Екатеринбург, 17-18 мая 2022 г. Екатеринбург: УГМУ, 2022;1843-1849.
- ## References
- Loftus M, Hassounah SA, Yooseph S. Bacterial community structure alterations within the colorectal cancer gut microbiome. *BMC Microbiol.* 2021 Mar 31;21(1):98. DOI: 10.1186/s12866-021-02153-x
  - Tang MS, Poles J, Leung JM, Wolff MJ, Davenport M, Lee SC, et al. Inferred metagenomic comparison of mucosal and fecal microbiota from individuals undergoing routine screening colonoscopy reveals similar differences observed during active inflammation. *Gut Microbes.* 2015;6(1):48-56. DOI: 10.1080/19490976.2014.1000080
  - Zhang YJ, Li S, Gan RY, Zhou T, Xu DP, Li HB. Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *Int J Mol Sci.* 2015 Apr 2;16(4):7493-519. DOI: 10.3390/ijms16047493
  - Immunobiological preparations and prospects for their use in infectology. Ed. Onishchenko GG, Aleshkin VA, Afanasyev SS, Pospelova VV. Moscow: State Educational Establishment VUNMC Ministry of Health of the Russian Federation, 2002. (In Russian).
  - MU 1.3.2569 – 09 Organization of the work of laboratories using nucleic acid amplification methods when working with material containing microorganisms of pathogenicity groups I–IV. (In Russian).
  - Bondarenko VM, Matsulevich TV. Intestinal dysbiosis as a clinical and laboratory syndrome: current state of the problem. Moscow: GEOTAR-media Publ., 2007. (In Russian).
  - Industry standard OST 91500.11.0004-12. 2003. Protocol for patient management. Intestinal dysbiosis. Approved. 06/09/03. (In Russian).
  - Appendix to the instructions for a set of reagents for studying the microbiota of the large intestine using the polymerase chain reaction method with real-time fluorescent detection COLONOFLOOR-16 (biocenosis) (ALFALAB LLC). (In Russian).
  - Medical microbiology, virology and immunology. Atlas manual. Textbook. Ed. Bykov AS, Zverev VV. M.: Publishing House Medical Information Agency LLC, 2018. (In Russian).
  - McCoy AN, Araújo-Pérez F, Azcárate-Peril A, Yeh JJ, Sandler RS, Keku TO. *Fusobacterium* is associated with colorectal adenomas. *PLoS One.* 2013;8(1):e53653. DOI: 10.1371/journal.pone.0053653
  - Brennan CA, Garrett WS. *Fusobacterium nucleatum* – symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nat Rev Microbiol.* 2019 Mar;17(3):156-166. DOI: 10.1038/s41579-018-0129-6
  - Zhang X, Zhu X, Cao Y, Fang JY, Hong J, Chen H. Fecal *Fusobacterium nucleatum* for the diagnosis of colorectal tumor: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Med.* 2019 Feb;8(2):480-491. DOI: 10.1002/cam4.1850
  - Osman MA, Neoh H-M, Ab Mutalib N-S, Chin SF, Mazlan L, Ali RAR, et al. *Parvimonas micra*, *Peptostreptococcus stomatis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Akkermansia muciniphila* as a four-bacteria biomarker panel of colorectal cancer. *Sci Rep.* 2021 Feb 3;11(1):2925. DOI: 10.1038/s41598-021-82465-0
  - Guo S, Li L, Xu B, Li M, Zeng Q, Xiao H, et al. A Simple and Novel Fecal Biomarker for Colorectal Cancer: Ratio of *Fusobacterium nucleatum* to Probiotics Populations, Based on Their Antagonistic Effect. *Clin Chem.* 2018 Sep;64(9):1327-1337. DOI: 10.1373/clinchem.2018.289728
  - Lopez-Siles M, Duncan SH, Garcia-Gil LJ, Martinez-Medina M. *Faecalibacterium prausnitzii*: from microbiology to diagnostics and prognostics. *ISME J.* 2017 Apr;11(4):841-852. DOI: 10.1038/ismej.2016.176
  - Zagato E, Pozzi C, Bertocchi A, Schioppa T, Saccheri F, Guglietta S, et al. Endogenous murine microbiota member *Faecalibaculum rodentium* and its human homologue protect from intestinal tumour growth. *Nat Microbiol.* 2020 Mar;5(3):511-524. DOI: 10.1038/s41564-019-0649-5
  - Litusov NV. Genus *Bacteroides*. Illustrated textbook. Ekaterinburg: Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education USMU, 2017. (In Russian).
  - Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science.* 2001 Feb 2;291(5505):881-4. DOI: 10.1126/science.291.5505.881
  - Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AG, et al. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol.* 2004 Jan;5(1):104-12. DOI: 10.1038/ni1018
  - Wrzosek L, Miquel S, Noordine ML, Bouet S, Joncquel Chevalier-Curt M, Robert V, et al. *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biol.* 2013 May 21;11:61. DOI: 10.1186/1741-7007-11-61
  - Stasilovich ZK, Dzhikidze EK, Kalashnikova VA, Sultanova OA. Study of the role of anaerobic bacteria in the intestinal pathology of monkeys. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2013;156(8):215. (In Russian).
  - Proshchenko DA, Zornikov DL, Voroshilina ES. Results of assessing the intestinal microbiota of people of different age groups using the Colonoflor-16 PCR system. *Current issues of modern medicine science and healthcare: materials of the VII International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Students.* Ekaterinburg, May 17-18, 2022. Ekaterinburg: USMU, 2022;1843-1849. (In Russian).

### Информация о соавторе:

Аршба Илона Мурмановна, кандидат биологических наук, и.о. начальника лаборатории инфекционной патологии, ведущий научный сотрудник, ФГБУ «Курчатовский комплекс медицинской приматологии» НИЦ «Курчатовский институт»

### Information about co-author:

Ilona M. Arshba, PhD in Biological Sciences, Acting Head of the Laboratory of Infectious Pathology, Leading Researcher, FSBI "Kurchatov complex of medical primatology" of NRC "Kurchatov Institute"

# Детекция генов вирулентности некоторых представителей порядка *Flavobacteriales*, выделенных от пациентов с муковисцидозом

К.В.Зубова<sup>1</sup>, В.А.Кузнецова<sup>1</sup>, М.В.Каневский<sup>1</sup>, О.В.Кондратенко<sup>2</sup>, Е.В.Глинская<sup>1</sup>, Д.М.Голубев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского», Саратов, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара, Российская Федерация

В последние годы увеличилась частота встречаемости возбудителей, ранее относившихся к сапрофитной флоре, в респираторном тракте больных муковисцидозом. Целью исследования являлась детекция некоторых генов вирулентности родов *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia* и *Empedobacter*, выделенных от пациентов с муковисцидозом из разных регионов Российской Федерации. Задачей исследования являлось обнаружение генов нейраминидазы, гиалуронидазы, коллагеназы, эластазы, фосфолипазы, уреазы и гемолизина у изучаемых бактерий. Использованы 17 штаммов бактерий, относящихся к видам *Chryseobacterium arthrosphaerae*, *Chryseobacterium gleum*, *Elizabethkingia meningoseptica*, *Elizabethkingia anopheles* и *Empedobacter falsenii*. ДНК выделяли при помощи готовой реакционной смеси 5X ScreenMix (ЗАО «Евроген»), предназначенной для проведения полимеразной цепной реакции с последующим обнаружением продуктов амплификации методом горизонтального гель-электрофореза. Установлено, что штаммы родов *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia*, *Empedobacter* являются носителями большого числа генов вирулентности, могут проявлять патогенные свойства и участвовать в хроническом инфекционном процессе респираторного тракта больных муковисцидозом.

**Ключевые слова:** муковисцидоз, гены вирулентности, *Flavobacteriales*

**Для цитирования:** Зубова К.В., Кузнецова В.А., Каневский М.В., Кондратенко О.В., Глинская Е.В., Голубев Д.М. Детекция генов вирулентности некоторых представителей порядка *Flavobacteriales*, выделенных от пациентов с муковисцидозом. Бактериология. 2024; 9(1): 52–57. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-52-57

## Analysis of virulence genes of some representatives of the order *Flavobacteriales* isolated from patients with cystic fibrosis

K.V.Zubova<sup>1</sup>, V.A.Kuznetsova<sup>1</sup>, M.V.Kanevsky<sup>1</sup>, O.V.Kondratenko<sup>2</sup>, E.V.Glinskaya<sup>1</sup>, D.M.Golubev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>N.G.Chernyshevsky Saratov National Research State University, Saratov, Russian Federation;

<sup>2</sup>Samara State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Samara, Russian Federation

In recent years, the frequency of occurrence of pathogens previously related to saprophytic flora in the respiratory tract of patients with cystic fibrosis has increased. The study was aimed at detection of some virulence genes responsible for the expression of enzymes involved in the colonization and persistence of certain bacterial species of the genera *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia* and *Empedobacter* isolated from patients with cystic fibrosis from different regions of the Russian Federation. The objective of the research was to detect the gene of sialidase, hyaluronidase, collagenase, elastase, phospholipase, urease and hemolysin in the studied bacteria and to conclude about the ability of bacteria to participate in the infectious process. 17 strains of bacteria belonging to the genera *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia* and *Empedobacter* were used. DNA was isolated using a ready-made reaction mixture 5X ScreenMix (CJSC "Eurogen"), designed for PCR with subsequent analysis on gel electrophoresis. Strains of the genera *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia*, *Empedobacter* are carriers of a large number of virulence genes, can be pathogens and participate in the chronic infectious process of the respiratory tract of patients with cystic fibrosis.

**Key words:** cystic fibrosis, virulence genes, *Flavobacteriales*

**For citation:** Zubova K.V., Kuznetsova V.A., Kanevsky M.V., Kondratenko O.V., Glinskaya E.V., Golubev D.M. Analysis of virulence genes of some representatives of the order *Flavobacteriales* isolated from patients with cystic fibrosis. Bacteriology. 2024; 9(1): 52–57. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-52-57

### Для корреспонденции:

Зубова Ксения Валерьевна, аспирант кафедры микробиологии и физиологии растений ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского»

Адрес: 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83

Статья поступила 10.02.2023, принята к печати 29.03.2024

### For correspondence:

Ksenia V. Zubova, postgraduate student of the Department of Microbiology and Plant Physiology, N.G.Chernyshevsky Saratov National Research State University

Address: 83 Astrakhanskaya str., Saratov, 410012, Russian Federation

The article was received 10.02.2023, accepted for publication 29.03.2024

Одним из самых распространенных генетических заболеваний является муковисцидоз (МВ) [1]. Он характеризуется рядом полиорганных нарушений, в т.ч. нарушениями мукоцилиарного клиренса, связанного с мутацией гена CFTR, что влечет за собой хроническое обсеменение дыхательных путей бактериями, грибами и вирусами. Это является главной причиной смертности среди пациентов [2].

В последние годы увеличилась частота встречаемости возбудителей, ранее относившихся к сапрофитной флоре, в респираторном тракте больных МВ. Особенно усиливается роль представителей порядка *Flavobacteriales*, которые относятся к группе неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов [3]. Среди данного порядка особый интерес вызывают близкородственные бактерии родов *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia* и *Empedobacter*.

Эта группа бактерий характеризуется устойчивостью к физико-химическим факторам окружающей среды [4], наличием природной резистентности ко многим антимикробным препаратам [5], а также способностью вызывать серьезные заболевания у людей с хроническими инфекциями и иммунодефицитными состояниями [6, 7].

Несмотря на участвовавшие случаи инфекций, вызванных бактериями данных родов, их факторы вирулентности недостаточно изучены, нет систематизированных данных об их роли в инфекционном процессе и особенностях клинических проявлений.

В микробиологии все факторы вирулентности бактерий разделяют на 4 группы, каждая из которых ответственна за определенные свойства микроорганизмов [8, 9]. В одну из групп входят токсины и токсические продукты, разделенные на подгруппы в соответствии с механизмом действия, которые способны вызвать патологические изменения в органах и тканях макроорганизма [10]. Бактериальные экзоферменты и экзотоксины, такие как гиалуронидаза, коллагеназа и фосфолипаза, способны разрушать внеклеточный матрикс, а также плазматическую мембрану эукариот с помощью гидролиза или за счет формирования пор [11] и нарушения

транспортов ионов через плазмолемму [12–15]. Фермент уреазы способствует выживаемости за счет повышения pH окружающей среды и повреждения эпителиальных клеток [16, 17]. Лецитиназа может вызывать гемолиз и разрушение мембран, что приводит к лизису клеток [18, 19].

**Целью исследования** являлась детекция некоторых генов вирулентности родов *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia* и *Empedobacter*, выделенных от пациентов с МВ из разных регионов Российской Федерации.

Задачей исследования было обнаружение генов нейраминидазы, гиалуронидазы, коллагеназы, эластазы, фосфолипазы, уреазы и гемолизина у изучаемых бактерий.

## Материалы и методы

Были исследованы 17 штаммов бактерий, относящихся к родам *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia* и *Empedobacter*, выделенных от пациентов с МВ из разных регионов Российской Федерации. Микроорганизмы выделены из респираторного тракта пациентов. Сбор и транспортировку респираторных образцов от пациентов с МВ осуществляли в соответствии с методикой, изложенной в «Руководстве по микробиологической диагностике инфекций дыхательных путей у пациентов с муковисцидозом» [20]. Биологический материал был собран самими пациентами или при помощи среднего медицинского персонала. Респираторные образцы были представлены свободно отделяемой мокротой и мазками со слизистой глубоких отделов задней стенки глотки. Первичный посев осуществляли на поверхности чашек Петри с 5%-м кровяным агаром с использованием техники посева «штрихом» с последующим инкубированием в термостате при температуре 37°C в течение 24 ч [20]. Бактерии идентифицировали с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, США) с использованием прибора Microflex и программного обеспечения MALDI Biotyper 3 RTC (Bruker Daltonics, Германия). Масс-

Таблица 1. Характеристика генов и праймеров, применяемых в исследовании  
 Table 1. Characteristics of the genes and primers used in the study

Ген, кодирующий синтез фермента / The gene encoding enzyme synthesis	Название фермента / The name of the enzyme	Прямой/обратный праймер / Forward/Reverse Primer	Молекулярный вес / Molecular weight
f2z28_rs08635	Нейроминидаза / <i>Neurominidase</i>	GAACATGTACCGCCTTCCCA AGAGGCATTGAGTTCCACCG	945
bstab16_rs23140	Гиалуронидаза / <i>Hyaluronidase</i>	AGCAATGAGCGTAAAACGCAA TTCCGTGCCCTAACTCATGT	985
e5165_rs04885	Коллагеназа / <i>Collagenase</i>	ATCGAACTCATGTCTCCGGC TGCCGATCCTGGAATATCGC	954
lasB	Эластаза / <i>Elastase</i>	AGCAATGAGCGTAAAACGCAA TTCCGTGCCCTAACTCATGT	985
ureC	Уреаза / <i>Urease</i>	TTGGCGGTGGTAAAACCGTA CTTCCCATCGCCTGAGAGTC	976
bbd35-rs01550	Гемолизин / <i>Hemolysin</i>	AGCCCGCAATTTCAATCG ATTCCCTCTGTACCCCGAA	927
bbd35_rs12855	Фосфолипаза / <i>Phospholipase</i>	AGATCCGGTAAGCGGAGAGA GGCCCGAATACTTCCAGTC	987

Таблица 2. Количество штаммов с положительным результатом (абс./%)  
 Table 2. Number of strains with a positive result (abs./%)

Ген/Кодируемый фермент / The gene/Encoded enzyme	Виды бактерий / Bacterial species				
	<i>C. arthrosphaerae</i>	<i>C. gleum</i>	<i>E. meningoseptica</i>	<i>E. anopheles</i>	<i>E. falsenii</i>
e5165_rs04885 / Коллагеназа / Collagenase	5/100	3/100	3/100	3/100	3/100
lasB / Эластаза / Elastase	3/60	3/100	2/67	2/67	1/33
f2z28_rs08635 / Нейраминидаза / Sialidase	2/40	1/33	1/33	1/33	1/33
bstab16_rs23140 / Гиалуронидаза / Hyaluronidase	1/20	1/33	1/33	2/67	3/100
ureC / Уреаза	3/60	3/100	1/33	2/67	1/33
bbd35-rs01550 / Гемолизин / Hemolysin	4/80	3/100	1/33	2/67	3/100
bbd35_rs12855 / Фосфолипаза / Phospholipase	3/60	3/100	2/67	2/67	1/33

спектрометрию проводили согласно протоколу, предложенному производителем. При идентификации было обнаружено 5 штаммов бактерии *Chryseobacterium arthrosphaerae*, 3 штамма *Chryseobacterium gleum*, 3 штамма *Elizabethkingia meningoseptica*, 3 штамма *Elizabethkingia anopheles* и 3 штамма *Empedobacter falsenii*. После идентификации микроорганизмы засеивали на поверхность чашек Петри с 5%-м кровяным агаром методом посева «штрихом» и инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 24 ч.

Анализ ДНК на наличие искомым генов проводили с помощью готовой реакционной смеси 5X ScreenMix (ЗАО «Евроген»), предназначенной для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим анализом на гель-электрофорезе. В состав 5X ScreenMix входят: Taq ДНК-полимераза, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, Mg<sup>2+</sup> и реакционный буфер, а также красители для непосредственного нанесения реакционной смеси на гель при проведении электрофоретического анализа. Ввиду малой изученности бактерий порядка *Flavobacteriales*, в т.ч. их ферментативной активности и генов, кодирующих ферменты, которые являются факторами патогенности, праймеры для проведения ПЦР были подобраны нами самостоятельно с использованием литературных данных о генетических особенностях микроорганизмов, имеющих общие филогенетические линии с бактериями изучаемого порядка. Праймеры были составлены с помощью сайта BLAST и синтезированы компанией ЗАО «Евроген» (табл. 1).

Маркером молекулярного веса являлся O'RangeRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США). Электрофорез проводили с помощью прибора горизонтального электрофореза серии ЕС 12-13 (Biosom, Россия), детекцию продуктов ПЦР-амплификации в ультрафиолете осуществляли с использованием трансиллюминатора UVT-1 (Biosom, Россия).

Было изучено наличие ряда генов, кодирующих ферменты, которые являются факторами вирулентности. Ферменты относились к классу гидролаз, подклассу протеаз. Определяли наличие генов коллагеназы, эластазы, нейраминидазы, гиалуронидазы, уреазы, гемолизина и фосфолипазы у исследованных бактерий.

## Результаты исследования

Результаты проведенных исследований показали, что исследуемые штаммы продуцируют от двух до семи факторов вирулентности (табл. 2).

Из 17 изученных штаммов у всех был обнаружен ген коллагеназы. Штаммовые различия по этому признаку отсутствуют, что может свидетельствовать о коллагеназной активности, присущей бактериям исследованных видов. Ген эластазы был обнаружен у большей части бактерий видов *E. meningoseptica* и *E. anopheles*, что может указывать на общеродовую особенность. Внутри рода *Chryseobacterium* отмечены небольшие штаммовые различия по наличию гена эластазы. Меньшее число штаммов с положительным результатом было зафиксировано для штаммов вида *E. falsenii*. Ген нейраминидазы оказался наиболее слабо представлен в геномах изученных штаммов всех видов трех родов. Гиалуронидаза отмечена у всех штаммов вида *E. falsenii*, для видов *E. meningoseptica* и *E. anopheles* наблюдается штаммовая вариабельность. Наименьшее число штаммов, содержащих ген гиалуронидазы, было обнаружено у бактерий рода *Chryseobacterium*, а именно у вида *C. arthrosphaerae*. Гиалуронидаза в данном исследовании может быть рассмотрена как непостоянный признак, который варьирует у штаммов как внутри рода, так и внутри видов. Наличие гена уреазы имело штаммовые различия у бактерий родов *Chryseobacterium* и *Elizabethkingia*. Для изученных бактерий вида *E. falsenii* ген уреазы был зафиксирован только у одного штамма (рис. 1). Присутствие гена гемолизина было отмечено для большинства штаммов родов *Chryseobacterium* и *Empedobacter*, для бактерий рода *Elizabethkingia* наблюдаются как видовые, так штаммовые различия (рис. 2). У большинства штаммов бактерий рода *Chryseobacterium* обнаружен ген фосфолипазы, для бактерий рода *Elizabethkingia* отмечены видовые и штаммовые различия, 33% штаммов *E. falsenii* имеют данный ген.

Можно сделать вывод, что гены коллагеназы, гемолизина и фосфолипазы могут быть характерными для целого семейства Weeksellaceae, к которому относятся рода *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia* и *Empedobacter*. Эластаза, нейраминидаза, гиалуронидаза, уреазы проявили большую вариабельность и могут быть характерны для одного рода, например ген уреазы и эластазы, или варьировать между штаммами одного вида, как ген гиалуронидазы.

## Обсуждение

Т.В.Фадеева и соавт. [21] описывали ферменты, участвующие в разрушении тканей и клеток макроорганизма у бак-

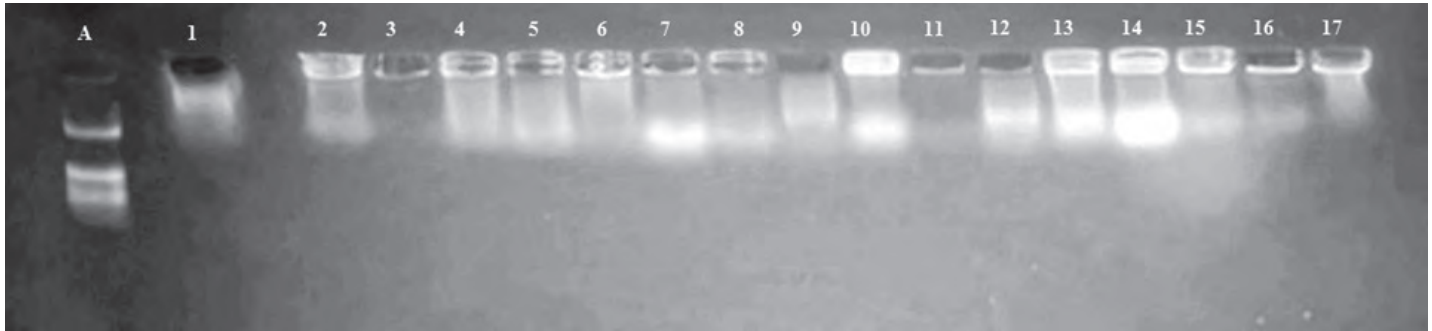


Рис. 1. Визуализация ПЦР-продукта гена уреазы: А – маркер молекулярного веса, цифры – номера штаммов, где 1, 4, 5, 9, 12, 17 – *C. arthrosphaerae*; 2, 15, 16 – *E. falsenii*; 3, 10, 13 – *E. meningoseptica*; 6, 7, 11 – *E. anopheles*.

Fig. 1. Visualization of the PCR product of the urease gene: A – a marker of molecular weight, and the numbers are strain numbers: 1, 4, 5, 9, 12, 17 – *C. arthrosphaerae*; 2, 15, 16 – *E. falsenii*; 3, 10, 13 – *E. meningoseptica*; 6, 7, 11 – *E. anopheles*.

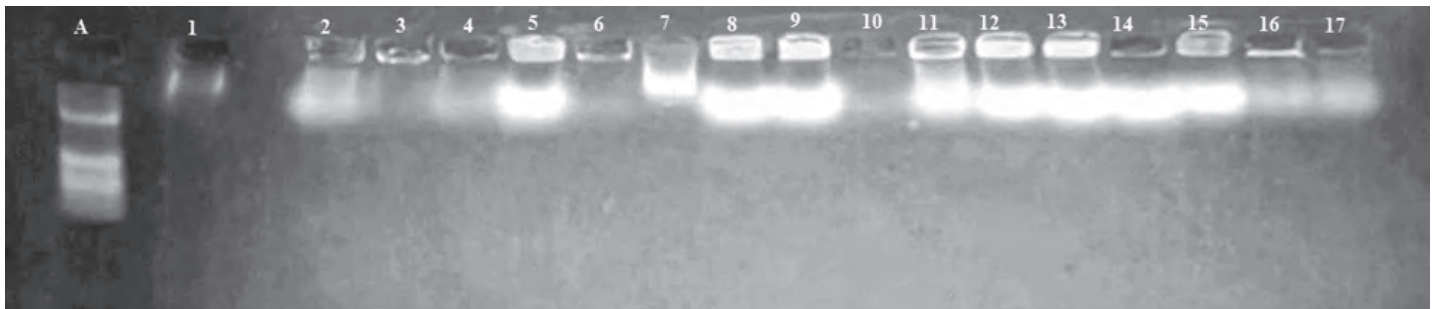


Рис. 2. Визуализация ПЦР-продукта гена гемолизина: А – маркер молекулярного веса, цифры – номера штаммов: 1, 4, 5, 9, 12, 17 – *C. arthrosphaerae*; 2, 15, 16 – *E. falsenii*; 3, 10, 13 – *E. meningoseptica*; 6, 7, 11 – *E. anopheles*.

Fig. 2. Visualization of the PCR product of the hemolysin gene: A – a marker of molecular weight, the numbers are strain numbers: 1, 4, 5, 9, 12, 17 – *C. arthrosphaerae*; 2, 15, 16 – *E. falsenii*; 3, 10, 13 – *E. meningoseptica*; 6, 7, 11 – *E. anopheles*.

терий *Bacteroides fragilis*, которые являются близкородственными для бактерий родов *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia* и *Empedobacter*. Авторы описывали механизмы и действие ферментов на клетки восприимчивого организма. Показано действие коллагеназы, разрушающей коллагеновую структуру соединительной ткани, нейраминидазы, которая способна к деструкции нейрамина кислоты гликопротеинов плазмы и входящей в состав рецепторов поверхности клеток слизистых оболочек. За разрушение гиалуроновой кислоты, являющейся основным веществом соединительной ткани, ответствен фермент гиалуронидаза. Гемолизины и цитолизины обеспечивают микроорганизму преимущество при инвазии за счет цитотоксической и мембраноповреждающей активности данных ферментов, что непосредственно влияет на тяжесть течения заболевания при нозокомиальной и внебольничной бактериемии. Исследование за 2020 г. [22] также указывает на участие этих ферментов в инфекционном процессе.

В работе 2022 г. [23] описаны 38 штаммов бактерий *Chryseobacterium*. Все исследуемые культуры имели фермент гемолизин и были способны к гемолизу, что согласуется с полученными нами данными. Также большинство исследуемых штаммов *S. gleum* и *E. meningoseptica* показали наличие фермента лецитиназы, гиалуронидазы и эластазы, что подтверждает результаты наших исследований, а также согласуется с более ранними литературными данными [24]. В исследовании Shicheng, Soehnlén et al. [25] было обнаружено 44 гена, кодирующих различные факторы вирулентности бактерий *E. meningoseptica*, *E. anophelis* и *Elizabethkingia miricola*.

## Заключение

Исследуемые штаммы бактерий родов *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia* и *Empedobacter* продуцируют от двух до семи факторов вирулентности, вследствие чего можно утверждать, что данные бактерии имеют потенциальную возможность проявлять патогенные свойства [26] и участвовать в хроническом инфекционном процессе респираторного тракта больных МВ.

### Финансовая поддержка

Бюджетное финансирование.

### Financial support

Budget financing.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

## Литература

1. Кондратьева ЕИ, Красовский СА, Старина МА, и др. Регистр пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации. 2022.
2. Кондратенко ОВ, Жестков АВ, Никитина ТР, и др. Особенности микробиологического обследования при муковисцидозе. Учебное пособие для студентов. Самарский государственный медицинский университет, 2021.
3. Зубова КВ, Кондратенко ОВ, Глинская ЕВ. Особенности видового и географического распределения некоторых представителей порядка *Flavobacteriales* у пациентов с муковисцидозом. В сборнике: Актуальные вопросы эксперимен-



- тальной микробиологии: теория, методология, практика, инноватика. Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 85-летию основания кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и 100-летию со дня рождения профессора Людвиги Микртычевны Закарян. Курск, 2022.
- McBride MJ. The Family *Flavobacteriaceae*. The Prokaryotes. 2014;75(21):643-667. DOI: 10.1007/978-3-642-38954-2\_130
  - de Carvalho Filho ÉB, Marson FAL, Levy CE. Challenges in the identification of *Chryseobacterium indologenes* and *Elizabethkingia meningoseptica* in cases of nosocomial infections and patients with cystic fibrosis. New Microbes New Infect. 2017 Sep 13;20:27-33. DOI: 10.1016/j.nmni.2017.09.002
  - Zhang Y, Zhao X, Xu S, Li Y. Clinical Characteristics and Risk Factors for Intra-Abdominal Infection with *Chryseobacterium indologenes* after Orthotopic Liver Transplantation. Pathogens. 2022 Sep 29;11(10):1126. DOI: 10.3390/pathogens11101126
  - Ademhan Tural D, Dogru Ersöz D, Emiralioglu N, Ozsezen B, Hazirolan G, Sunman B, et al. Clinical characteristics of children with cystic fibrosis infected with unusual bacteria. Minerva Pediatr (Torino). 2021 Apr 15. DOI: 10.23736/S2724-5276.21.06189-2
  - Вертиев ЮВ, Габрилович ИМ. Токсин-опосредованная обусловленность инфекционных заболеваний. Микробиология. 1987;3:86-93.
  - Баркус ММ, Бондаренко ВМ, Флуер ФС. Энтеротоксигенность бактерий рода *Klebsiella* и *Enterobacter*, определяемые иммунологическими методами. Лабораторное дело. 1986;9:556-558.
  - Туйгунов ММ, Габидуллин ЗГ, Зурочка АВ, Бухарин ОВ. Молекулярные механизмы взаимоотношений организма и патогенных энтеробактерий. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2003;4:23-27.
  - Габидуллин ЗГ, Ахтариева АА, Туйгунов ММ, Суфияров РС, Туйгунова ВГ, Суфияров РР, и др. Факторы патогенности бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, обеспечивающие выживание в организме хозяина. Медицинский вестник Башкортостана. 2009;4(5):86-94.
  - Laney DW Jr, Mann EA, Dellon SC, Perkins DR, Giannella RA, Cohen MB. Novel sites for expression of an *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin receptor in the developing rat. Am J Physiol. 1992 Nov;263(5 Pt 1):G816-21. DOI: 10.1152/ajpgi.1992.263.5.G816
  - Herold S, Karch H, Schmidt H. Shiga toxin-encoding bacteriophages – genomes in motion. Int J Med Microbiol. 2004 Sep;294(2-3):115-21. DOI: 10.1016/j.ijmm.2004.06.023
  - Бондаренко ВМ. Факторы патогенности бактерий и их роль в развитии инфекционного процесса. Микробиология. 1999;5:34-39.
  - Ban E, Dupré L, Hermann E, Rohn W, Vendeville C, Quatannens B, et al. CpG motifs induce Langerhans cell migration *in vivo*. Int Immunol. 2000 Jun;12(6):737-45. DOI: 10.1093/intimm/12.6.737
  - Rutherford JC. The emerging role of urease as a general microbial virulence factor. PLoS Pathog. 2014 May 15;10(5):e1004062. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004062
  - Kumar M, Bhardwaj M, Yadav P, Vashishth D. A review on distribution, properties, genetic organization, immobilisation and applications of urease. J of Applied and Natural Science. 2022;14(4):1413-1429. DOI: 10.31018/jans.v14i4.3668
  - Sharaf EF, El-Sayed WS, Abosaifa RM. Lecithinase-producing bacteria in commercial and home-made foods: Evaluation of toxic properties and identification of potent producers. J Taibah Univ. Sci. 2014;8:207-215.
  - Nathanson N, Gonzalez-Scaran F. Patterns of Infection. 2016;81-94. DOI: 10.1016/B978-0-12-800964-2.00007-0
  - Поликарпова СВ, Жилина СВ, Кондратенко ОВ, Лямин АВ, Борзова ОВ, Жесткова АВ. Руководство по микробиологической диагностике инфекций дыхательных путей у пациентов с муковисцидозом. М. – Тверь: «Триада», 2019.
  - Фадеева ТВ, Дремина НН, Шурыгина ИА, Челурных ЕЕ. *Bacteroides fragilis* в развитии абдоминальной хирургической инфекции. Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2018;154(3):5-11.
  - Kozhakhmetova S, Zholdybayeva E, Mukhtarova K, Ramankulov YeM. Pathogenicity Factors and Antibiotic Resistance of the *Bacteroides Fragilis*. Eurasian Journal of Applied Biotechnology. 2020; 1. DOI: 10.11134/btp.1.2020.1
  - Mwanza EP, Hugo A, Charimba G, Hugo CJ. Pathogenic Potential and Control of *Chryseobacterium* Species from Clinical, Fish, Food and Environmental Sources. Microorganisms. 2022 Apr 25;10(5):895. DOI: 10.3390/microorganisms10050895
  - Pavlov D, de Wet CM, Grabow WO, Ehlers MM. Potentially pathogenic features of heterotrophic plate count bacteria isolated from treated and untreated drinking water. Int J Food Microbiol. 2004 May 1;92(3):275-87. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.08.018
  - Janda JM, Lopez DL. Mini review: New pathogen profiles: *Elizabethkingia anophelis*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2017 Jun;88(2):201-205. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.03.007
  - Chen S, Soehnen M, Blom J, Terrapon N, Henrissat B, Walker ED. Comparative genomic analyses reveal diverse virulence factors and antimicrobial resistance mechanisms in clinical *Elizabethkingia meningoseptica* strains. PLoS One. 2019 Oct 10;14(10):e0222648. DOI: 10.1371/journal.pone.0222648

## References

- Kondrat'eva EI, Krasovsky SA, Starinova MA, et al. Registratsionnyy spisok mukovistsidozom v Rossiiskoi Federatsii. 2022. (In Russian).
- Kondratenko OV, Zhestkov AV, Nikitina TR, i soavt. Osobennosti mikrobiologicheskogo obsledovaniya pri mukovistsidoze. Uchebnoe posobie dlya studentov. Samarskii gosudarstvennyi meditsinskii universitet, 2021. (In Russian).
- Zubova KV, Kondratenko OV, Glinskaya EV. Osobennosti vidovogo i geograficheskogo raspredeleniya nekotorykh predstavitelei porjadka *Flavobacteriales* u patsientov s mukovistsidozom. V sbornike: Aktual'nye voprosy eksperimental'noi mikrobiologii: teoriya, metodologiya, praktika, innovatika. Materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi 85-letiyu osnovaniya kafedry mikrobiologii, virusologii, immunologii i 100-letiyu so dnya rozhdeniya professora Lyudvigi Mikrtychevny Zakaryan. Kursk, 2022. (In Russian).
- McBride MJ. The Family *Flavobacteriaceae*. The Prokaryotes. 2014;75(21):643-667. DOI: 10.1007/978-3-642-38954-2\_130
- de Carvalho Filho ÉB, Marson FAL, Levy CE. Challenges in the identification of *Chryseobacterium indologenes* and *Elizabethkingia meningoseptica* in cases of nosocomial infections and patients with cystic fibrosis. New Microbes New Infect. 2017 Sep 13;20:27-33. DOI: 10.1016/j.nmni.2017.09.002
- Zhang Y, Zhao X, Xu S, Li Y. Clinical Characteristics and Risk Factors for Intra-Abdominal Infection with *Chryseobacterium indologenes* after Orthotopic Liver Transplantation. Pathogens. 2022 Sep 29;11(10):1126. DOI: 10.3390/pathogens11101126
- Ademhan Tural D, Dogru Ersöz D, Emiralioglu N, Ozsezen B, Hazirolan G, Sunman B, et al. Clinical characteristics of children with cystic fibrosis infected with unusual bacteria. Minerva Pediatr (Torino). 2021 Apr 15. DOI: 10.23736/S2724-5276.21.06189-2
- Vertiev YuV, Gabrilovich IM. Toksin-oposredovannaya obuslovlennost' infektsionnykh zabolevanii. Microbiology. 1987;3:86-93. (In Russian).
- Barkus MM, Bondarenko VM, Fluier FS. Enterotoksigennost' bakterii roda *Klebsiella* i *Enterobacter*, opredelyaemye immunologicheskimi metodami. Laboratornoe delo. 1986;9:556-558. (In Russian).
- Tuigunov MM, Gabidullin ZG, Zurochka AV, Bukharin OV. Molecular mechanisms of relationships between the host organism and pathogenic enterobacteria. Journal of Microbiology Epidemiology Immunobiology. 2003;4:23-27. (In Russian).
- Gabidullin ZG, Akhtarieva AA, Tuigunov MM, Sufiarov RS, Tuigunova VG, Sufiarov RR, et al. The factors pathogenesis of bacteria family *Enterobacteriaceae* are providing in an organism of the owner. Bashkortostan Medical Journal. 2009;4(5):86-94. (In Russian).

12. Laney DW Jr, Mann EA, Dellon SC, Perkins DR, Giannella RA, Cohen MB. Novel sites for expression of an *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin receptor in the developing rat. *Am J Physiol*. 1992 Nov;263(5 Pt 1):G816-21. DOI: 10.1152/ajpgi.1992.263.5.G816
13. Herold S, Karch H, Schmidt H. Shiga toxin-encoding bacteriophages – genomes in motion. *Int J Med Microbiol*. 2004 Sep;294(2-3):115-21. DOI: 10.1016/j.ijmm.2004.06.023
14. Bondarenko VM. Faktory patogennosti bakterii i ikh rol' v razvitiu infektsionnogo protsessa. *Microbiology*. 1999;5:34-39. (In Russian).
15. Ban E, Dupré L, Hermann E, Rohn W, Vendeville C, Quatannens B, et al. CpG motifs induce Langerhans cell migration *in vivo*. *Int Immunol*. 2000 Jun;12(6):737-45. DOI: 10.1093/intimm/12.6.737
16. Rutherford JC. The emerging role of urease as a general microbial virulence factor. *PLoS Pathog*. 2014 May 15;10(5):e1004062. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004062
17. Kumar M, Bhardwaj M, Yadav P, Vashishth D. A review on distribution, properties, genetic organization, immobilisation and applications of urease. *J of Applied and Natural Science*. 2022;14(4):1413-1429. DOI: 10.31018/jans.v14i4.3668
18. Sharaf EF, El-Sayed WS, Abosaifa RM. Lecithinase-producing bacteria in commercial and home-made foods: Evaluation of toxic properties and identification of potent producers. *J Taibah Univ. Sci*. 2014;8:207-215.
19. Nathanson N, Gonzalez-Scaran F. Patterns of Infection. 2016;81-94. DOI: 10.1016/B978-0-12-800964-2.00007-0
20. Polikarpova SV, Zhilina SV, Kondratenko OV, Lyamin AV, Borzova OV, Zhestkova AV. Rukovodstvo po mikrobiologicheskoi diagnostike infektsii dykhatel'nykh putei u patsientov s mukovistsidozom. Moscow – Tver': «Triada» Publ., 2019. (In Russian).
21. Fadeeva TV, Dremina NN, Shurygina IA, Chepurnykh EE. *Bacteroides fragilis* in the development of abdominal surgical infection. *Sibirskii meditsinskii zhurnal (Irkutsk)*. 2018;154(3):5-11. (In Russian).
22. Kozhakhmetova SS, Zholdybayeva EV, Mukhtarova K, Ramankulov YeM. Pathogenicity Factors and Antibiotic Resistance of the *Bacteroides Fragilis*. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*. 2020; 1. DOI: 10.11134/btp.1.2020.1
23. Mwanza EP, Hugo A, Charimba G, Hugo CJ. Pathogenic Potential and Control of *Chryseobacterium* Species from Clinical, Fish, Food and Environmental Sources. *Microorganisms*. 2022 Apr 25;10(5):895. DOI: 10.3390/microorganisms10050895
24. Pavlov D, de Wet CM, Grabow WO, Ehlers MM. Potentially pathogenic features of heterotrophic plate count bacteria isolated from treated and untreated drinking water. *Int J Food Microbiol*. 2004 May 1;92(3):275-87. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.08.018
25. Janda JM, Lopez DL. Mini review: New pathogen profiles: *Elizabethkingia anophelis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017 Jun;88(2):201-205. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.03.007
26. Chen S, Soehnen M, Blom J, Terrapon N, Henrissat B, Walker ED. Comparative genomic analyses reveal diverse virulence factors and antimicrobial resistance mechanisms in clinical *Elizabethkingia meningoseptica* strains. *PLoS One*. 2019 Oct 14;14(10):e0222648. DOI: 10.1371/journal.pone.0222648

#### Информация о соавторах:

Кузнецова Виктория Александровна, магистр кафедры микробиологии и физиологии растений ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского»

Каневский Матвей Владимирович, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии и биофизики ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского»

Кондратенко Ольга Владимировна, доктор медицинских наук, доцент, врач высшей квалификационной категории по специальности «Бактериология» ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет»

Глинская Елена Владимировна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии и физиологии растений ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского»

Голубев Дмитрий Михайлович, студент 4-го курса кафедры микробиологии и физиологии растений ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского»

#### Information about co-authors:

Victoria A. Kuznetsova, Master of Department of Microbiology and Plant Physiology, N.G.Chernyshevsky Saratov National Research State University

Matvey V. Kanevsky, PhD in Biological Sciences, Associate Professor of Department of Biochemistry and Biophysics, N.G.Chernyshevsky Saratov National Research State University

Olga V. Kondratenko, MD, PhD, DSc, doctor of the highest qualification category in the specialty "Bacteriology", Associate Professor of Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University

Elena V. Glinskaya, PhD in Biological Sciences, Associate Professor of Department of Microbiology and Plant Physiology, N.G.Chernyshevsky Saratov National Research State University

Dmitry M. Golubev, student of Department of Microbiology and Plant Physiology, N.G.Chernyshevsky Saratov National Research State University

## Нераскрытый потенциал бактериальных соединений и генов, связанных с токсином, вызывающим рак толстой кишки

*In silico* разработка генома обеспечивает легкий доступ к кластерам генов биосинтеза вторичных метаболитов (BGC), кодирующим биосинтез многих биологически активных соединений, которые являются основой для многих важных лекарственных, используемых в медицине. Проанализировано 3889 геномов энтеробактерий и обнаружено 13 266 BGC, представленных 252 различными семействами BGC и 347 дополнительными одиночками. Анализ пангенома выявил 88 генов, предположительно связанных со специфическим BGC, кодирующим связанный с раком толстой кишки колибактин, который кодирует различные метаболические и регуляторные функции. Представленный рабочий процесс открывает возможность обнаружения новых вторичных метаболитов, лучшего понимания их физиологической роли и предоставляет руководство по идентификации и анализу наборов генов, связанных с BGC.

Mohite OS, et al.

*Pangenome analysis of Enterobacteria reveals richness of secondary metabolite gene clusters and their associated gene sets. Synthetic and Systems Biotechnology*. 2022;(7):900-10.

# Изучение кишечной микробиоты методом культуromики

Б.О.Бембеева<sup>1,2</sup>, Е.Л.Исаева<sup>1,3</sup>, В.В.Муравьева<sup>1</sup>, К.Н.Жигалова<sup>1</sup>, Р.В.Изыумов<sup>1</sup>, О.В.Нечаева<sup>1</sup>, Т.В.Припутневич<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация;

<sup>3</sup>ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Около 90% микроорганизмов, заселяющих кишечник, являются труднокультивируемыми облигатно-анаэробными бактериями, обнаружить которые можно исключительно с использованием метода высокопроизводительного секвенирования. Большинство из них являются продуцентами короткоцепочечных жирных кислот, которые принимают участие в регулировании функций различных систем органов. Метод культуromики, благодаря подбору условий культивирования и питательных сред, позволяет выделить данные бактерии и изучить их фенотипические свойства. Проведенное исследование посвящено изучению видового разнообразия облигатно-анаэробных бактерий кишечной микробиоты, выделенных из биологического материала взрослых людей с использованием метода культуromики, и обоснованию выбора оптимальных специализированных питательных сред для их выращивания.

**Ключевые слова:** культуromика, труднокультивируемые бактерии, облигатные анаэробы, микробиота кишечника, короткоцепочечные жирные кислоты

**Для цитирования:** Бембеева Б.О., Исаева Е.Л., Муравьева В.В., Жигалова К.Н., Изюмов Р.В., Нецаева О.В., Припутневич Т.В. Изучение кишечной микробиоты методом культуromики. Бактериология. 2024; 9(1): 58–62. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-58-62

## Study of intestinal microbiota by culturomics

В.О.Бембеева<sup>1,2</sup>, Е.Л.Исаева<sup>1,3</sup>, В.В.Муравьева<sup>1</sup>, К.Н.Жигалова<sup>1</sup>, Р.В.Изыумов<sup>1</sup>, О.В.Нечаева<sup>1</sup>, Т.В.Припутневич<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Academician V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

<sup>2</sup>N.I.Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia Federation;

<sup>3</sup>Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

About 90% of microorganisms in the gut are difficult culture obligate-anaerobic bacteria that can only be detected using high-throughput sequencing. Most of them are producers of short-chain fatty acids, which are involved in regulating the functions of various organ systems. The culture method allows the isolation of these bacteria and the study of their phenotypic properties due to the selection of cultivation conditions and culture media. This research is devoted to the study of species diversity of obligate-anaerobic bacteria of the gut microbiota, isolated from biological material of adults using the culturomics method, and substantiation of the selection of optimal special culture media for their cultivation.

**Key words:** culturomics, difficult culture bacteria, obligate anaerobes, gut microbiota, SCFA.

**For citation:** Bembeeva B.O., Isaeva E.L., Muravieva V.V., Zhigalova K.N., Izyumov R.V., Nechaeva O.V., Pripitnevich T.V. Study of intestinal microbiota by culturomics. Bacteriology. 2024; 9(1): 58–62. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-58-62

### Для корреспонденции:

Бембеева Байр Очировна, заведующий врач-бактериолог референс-центра Министерства здравоохранения Российской Федерации по предупреждению распространения биологических угроз института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова» Минздрава России

Адрес: 117997, Москва, ул. Акад. Опарина, 4  
Телефон: +7 962 7282135

Статья поступила 16.02.2023, принята к печати 29.03.2024

### For correspondence:

Bayr O. Bembeeva, Head-doctor-bacteriologist of the Reference Center of the Ministry of Health of the Russian Federation for the Prevention of the Prevention of Biological Threats at the Institute of Microbiology, Antimicrobial Therapy and Epidemiology, Academician V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Address: 4 Academician Oparin str., Moscow, 117997, Russian Federation  
Phone: +7 962 7282135  
E-mail: b\_bembeeva@oparina4.ru

The article was received 16.02.2023, accepted for publication 29.03.2024

**Ж**елудочно-кишечный тракт – это динамичная экосистема, в которой взаимодействуют триллионы бактерий, вирусов, грибов и других одноклеточных организмов [1]. Кишечная микробиота представлена 1000–1500 видов бактерий, общее количество которых превышает  $10^{14}$  клеток [2–4].

Большая часть микробиоты здорового человека представлена бактериальными филумами *Bacteroidota* и *Bacillota*. Помимо широко известных *Bifidobacterium* spp., *Prevotella* spp. *Lactobacillus* spp., в составе кишечной микробиоты в большом количестве присутствуют и другие облигатно-анаэробные микроорганизмы, крайне чувствительные к кислороду, включая *Ruminococcus* spp. и *Faecalibacterium* spp., продуцирующие метаболиты – короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), которые участвуют в регулировании функции дистальных участков слизистой оболочки кишечника и других органов, влияя в т.ч. на производство и выход иммунных клеток и антител [5–9].

На данный момент труднокультивируемые облигатно-анаэробные бактерии являются объектами повышенного интереса, поскольку развитие молекулярно-биологических методов, в частности высокопроизводительного секвенирования, позволило расширить знания о составе микробиоты кишечника. Однако существующие ограничения метагеномного анализа, не позволяющие выделить эти микроорганизмы, изучить их фенотипические свойства, способствовали масштабному развитию методов культуромики, которые представляют собой культуральный подход, насчитывающий более 300 условий культивирования для выделения различных микроорганизмов, благодаря которому были открыты и описаны сотни новых бактерий. Использование данного метода позволило значительно расширить знания о составе микробиоты кишечника. За период 2015–2018 гг. количество микроорганизмов, выделенных методом культуромики, увеличилось на 28%, из которых две трети относятся к новым таксонам [10].

В работах ряда зарубежных авторов показано, что, например, у пациентов, перенесших COVID-19, численность бактерий, продуцирующих КЦЖК, резко снижается, что негативно влияет на тяжесть течения как самого заболевания, так и симптомов, развивающихся после его разрешения [11]. Детальное изучение анаэробных бактерий-продуцентов КЦЖК затруднено из-за сложности их выделения из биологического материала, подбора питательных сред и условий для их культивирования и сохранения. В современной отечественной и зарубежной литературе описаны разнообразные методические подходы, однако в большинстве случаев возникают трудности с их воспроизводимостью [12]. Поэтому проблема выделения и сохранения труднокультивируемых облигатно-анаэробных бактерий остается актуальной по сей день.

**Цель работы** – изучение разнообразия труднокультивируемых облигатно-анаэробных бактерий кишечной микробиоты и оптимизация их выделения с использованием специальных питательных сред.

#### Методика исследования

Для успешного выделения труднокультивируемых, крайне чувствительных к кислороду бактерий кишечной микробиоты требуется обязательное соблюдение особых условий

преаналитического этапа микробиологического исследования. Материалом для исследования были фекалии 20 взрослых людей. Свежесобранные фекалии помещали в стерильный контейнер для сбора биоматериала, заполняя весь его объем с целью создания условий, максимально приближенных к строго анаэробным. Важные моменты преаналитического этапа: быстрая доставка биоматериала в лабораторию, поскольку труднокультивируемые облигатные анаэробы гибнут в присутствии кислорода в течение нескольких минут [13]; посев в условиях анаэробной станции (Bactron300-2, Sheldon manufacturing) в атмосфере трехкомпонентной газовой смеси ( $H_2$  – 10%,  $N_2$  – 80%,  $CO_2$  – 10%) и предварительная регенерация питательных сред. На основании данных литературы были приготовлены питательные среды в двух вариантах: жидкие и плотные, наиболее часто используемые для выделения бактерий-продуцентов КЦЖК:

№ 1 – питательная среда на основе рубленого мяса с углеводами [14];

№ 2 – питательная среда на основе рубленого мяса [15];

№ 3 – питательная среда YCFA [16];

№ 4 – питательная среда BIFIDOBACTERIUM MEDIUM [17].

Для посева из толщи заполненного контейнера отбирали 1 г фекалий и помещали в среду накопления (жидкий вариант питательных сред). Материал инкубировали при 37°C в течение 96 ч: ежедневно из пробирок отбирали половину содержимого, выполняли десятикратное разведение в физиологическом растворе и высевали на плотные питательные среды, затем добавляли в пробирки свежую питательную среду до первоначального объема. Высев на плотные питательные среды производили ежедневно в течение инкубации в жидкой среде. Результаты посевов просматривали через 48 ч, проводили подсчет выросших колоний и идентификацию выделенных бактерий методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) на масс-спектрометре Microflex с программным обеспечением MaldiBioTyper версии 4.1 (BrukerDaltoniks, Германия), а при невозможности идентификации этим методом – путем секвенирования последовательности гена 16S рибосомальной РНК (по Сэнгеру) («Нанофор-05», Россия).

#### Результаты исследования

Использование MALDI-TOF MS для идентификации выделенных труднокультивируемых облигатно-анаэробных микроорганизмов не позволило установить их видовую принадлежность ввиду отсутствия информации о них в библиотеке масс-спектрометра, что, вероятно, связано с низкой частотой применения культуральных методов для их индикации.

Методом секвенирования по Сэнгеру идентифицированы облигатно-анаэробные труднокультивируемые бактерии, относящиеся к 15 родам: *Alistipes shahii*, *Anaerostipes hadrus*, *Blautia* sp., *Blautia intestinalis*, *Blautia massiliensis*, *Blautia wexlerae*, *Catenibacterium mitsuokai*, *Coprococcus comes*, *Coprococcus eutactus*, *Dorea longicatena*, *Eubacterium hallii*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Fusicatenibacter saccharivorans*, *Holdemanella* sp., *Intestinimonas butyriciproducens*, *Roseburia faecis*, *Ruminococcus* sp., *Ruminococcus gnavus*, *Ruminococcus lactaris*, *Sutterella stercoricanis*.

При учете результатов роста выделенных микроорганизмов на специальных питательных средах показано, что наибольшее видовое разнообразие получено при посеве всех образцов фекалий на среду №1 (таблица). Наибольшее количество видов анаэробных бактерий ( $n = 8$ ) было выделено из первого образца фекалий №1, однако в его посевах на среды №2 и №3 количество видов оказалось ниже в 2 раза, а на среду №4 – в 4 раза. Сходные результаты получены при посеве всех исследованных образцов биоматериала.

Обращает на себя внимание, что некоторые виды бактерий (*A. hadrus*, *Holdemanella* sp.) были способны расти на нескольких питательных средах. *F. prausnitzii*, один из важнейших продуцентов КЦЖК, выделялся на средах №№ 1, 2

и 3, но не рос на среде №4. То же самое относится и к виду *R. faecis*, который выделяли преимущественно на среде №4 и реже – на среде №1. Наименьшие ростовые свойства были установлены для среды №4, поскольку на ней наблюдался рост только представителей *Roseburia* spp., что является немаловажным фактом для селективного выделения бактерий рода *Roseburia*.

Таким образом, полученные результаты позволили установить, что среди исследованных питательных сред наиболее оптимальной для выделения труднокультивируемых анаэробных бактерий является вариант среды №1, поскольку ее использование позволило выявить наибольший видовой спектр труднокультивируемых облигатно-анаэробных микроорганизмов в образцах кишечной микробиоты.

Таблица. Эффективность выделения труднокультивируемых анаэробных бактерий с использованием специальных питательных сред  
 Table. Efficiency of isolating difficult-to-cultivate anaerobic bacteria using special nutrient media

Образец фекалий / Fecal sample	Выделенные микроорганизмы (варианты питательных сред) / Isolated microorganisms (culture media options)			
	Среда / Nutrient medium №1	Среда / Nutrient medium №2	Среда / Nutrient medium №3	Среда / Nutrient medium №4
1	<i>A. hadrus</i> , <i>F. prausnitzii</i> , <i>R. lactaris</i> , <i>C. eutactus</i> , <i>Holdemanella</i> sp., <i>S. stercoricanis</i> , <i>F. saccharivorans</i> , <i>I. butyriciproducens</i>	<i>A. hadrus</i> , <i>Blautia</i> sp., <i>Holdemanella</i> sp., <i>F. prausnitzii</i>	<i>A. hadrus</i> , <i>B. wexlerae</i> , <i>C. eutactus</i> , <i>F. prausnitzii</i> , <i>F. saccharivorans</i>	<i>R. faecis</i> , <i>Roseburia</i> sp.
2	<i>R. gnavus</i> , <i>R. faecis</i> , <i>D. longicatena</i> , <i>A. shahii</i> , <i>E. hallii</i>	<i>A. shahii</i>	<i>R. gnavus</i> , <i>D. longicatena</i>	<i>R. faecis</i> , <i>Roseburia</i> sp.
3	<i>B. intestinalis</i> , <i>F. prausnitzii</i> , <i>F. saccharivorans</i>	<i>Holdemanella</i> sp., <i>Blautia</i> sp.	<i>F. saccharivorans</i> , <i>F. prausnitzii</i> , <i>B. wexlerae</i>	<i>R. faecis</i>
4	<i>D. longicatena</i> , <i>F. prausnitzii</i>	<i>F. prausnitzii</i>	<i>F. prausnitzii</i> , <i>D. longicatena</i>	–
5	<i>F. prausnitzii</i> , <i>C. comes</i> , <i>B. rovincensis</i> , <i>A. shahii</i>	<i>Blautia</i> sp., <i>A. shahii</i>	<i>F. prausnitzii</i> , <i>C. comes</i> , <i>B. wexlerae</i>	<i>Roseburia</i> sp.
6	<i>S. stercoricanis</i> , <i>L. bacterium</i> , <i>A. shahii</i> , <i>C. mitsuokai</i> , <i>E. hallii</i>	<i>A. shahii</i> , <i>E. hallii</i>	<i>A. shahii</i>	–
7	<i>F. prausnitzii</i> , <i>C. comes</i> , <i>D. longicatena</i> , <i>B. provencensis</i>	<i>F. prausnitzii</i> , <i>Blautia</i> sp.	<i>F. prausnitzii</i> , <i>D. longicatena</i>	–
8	<i>A. hadrus</i> , <i>F. prausnitzii</i> , <i>I. butyriciproducens</i>	<i>A. hadrus</i> , <i>Holdemanella</i> sp.	<i>F. prausnitzii</i> , <i>A. hadrus</i>	–
9	<i>A. hadrus</i> , <i>F. prausnitzii</i> , <i>R. gnavus</i> , <i>R. lactaris</i>	<i>A. hadrus</i> , <i>A. shahii</i>	<i>A. hadrus</i> , <i>F. prausnitzii</i> , <i>R. gnavus</i>	<i>R. faecis</i> , <i>Roseburia</i> sp.
10	<i>F. prausnitzii</i> , <i>A. shahii</i>	<i>A. shahii</i>	<i>F. prausnitzii</i> , <i>A. shahii</i>	–
11	<i>S. stercoricanis</i> , <i>D. longicatena</i> , <i>A. shahii</i> , <i>E. hallii</i>	<i>Holdemanella</i> sp., <i>A. shahii</i> , <i>E. hallii</i>	<i>D. longicatena</i>	<i>R. faecis</i> , <i>Roseburia</i> sp.
12	<i>A. hadrus</i> , <i>C. eutactus</i> , <i>C. mitsuokai</i>	<i>A. hadrus</i>	<i>A. hadrus</i> , <i>C. eutactus</i>	<i>R. faecis</i> , <i>Roseburia</i> sp.
13	<i>F. prausnitzii</i> , <i>B. provencensis</i>	<i>F. prausnitzii</i> , <i>Blautia</i> sp.	<i>B. wexlerae</i>	–
14	<i>A. hadrus</i> , <i>A. shahii</i> , <i>F. prausnitzii</i>	<i>A. hadrus</i> , <i>A. shahii</i>	<i>F. prausnitzii</i> , <i>A. hadrus</i>	<i>R. faecis</i>
15	<i>F. prausnitzii</i> , <i>D. longicatena</i> , <i>R. faecis</i>	<i>F. prausnitzii</i>	<i>F. prausnitzii</i> , <i>D. longicatena</i>	<i>R. faecis</i>
16	<i>F. prausnitzii</i> , <i>I. butyriciproducens</i> , <i>C. minuta</i>	<i>Blautia</i> sp., <i>A. shahii</i>	<i>F. prausnitzii</i> , <i>B. wexlerae</i>	<i>R. faecis</i>
17	<i>F. prausnitzii</i> , <i>A. desmolans</i> , <i>R. gnavus</i> , <i>R. lactaris</i>	<i>F. prausnitzii</i>	<i>F. prausnitzii</i> , <i>R. gnavus</i>	<i>R. faecis</i> , <i>Roseburia</i> sp.
18	<i>L. bacterium</i> , <i>A. shahii</i> , <i>F. prausnitzii</i> , <i>C. comes</i> , <i>R. faecis</i> , <i>R. gnavus</i>	<i>A. shahii</i>	<i>R. gnavus</i> , <i>F. prausnitzii</i> , <i>C. comes</i>	–
19	<i>A. hadrus</i> , <i>I. butyriciproducens</i> , <i>R. gnavus</i> , <i>A. shahii</i> , <i>C. minuta</i>	<i>A. hadrus</i> , <i>A. shahii</i>	<i>A. hadrus</i> , <i>R. gnavus</i>	<i>R. faecis</i> , <i>Roseburia</i> sp.
20	<i>S. stercoricanis</i> , <i>F. prausnitzii</i> , <i>C. catus</i> , <i>D. longicatena</i>	<i>F. prausnitzii</i> , <i>Blautia</i> sp.	<i>F. prausnitzii</i> , <i>D. longicatena</i> , <i>B. wexlerae</i>	<i>Roseburia</i> sp.

Высокие ростовые свойства варианта среды №1, вероятно, связаны с присутствием в ней моно- и дисахаридов, таких как глюкоза, целлобиоза и мальтоза, которые могут быть использованы в качестве основного энергоресурса в метаболизме труднокультивируемых облигатно-анаэробных бактерий. Кроме того, использование этой среды является экономически выгодным, так как при ее приготовлении могут быть использованы ингредиенты отечественного производства, не снижающие ее ростовые свойства.

Результаты идентификации, полученные с использованием метода секвенирования по Сэнгеру, позволили расширить базу данных масс-спектрометра путем внесения новых масс-спектров видов труднокультивируемых облигатно-анаэробных бактерий, что в дальнейшем ускорит и удешевит их идентификацию.

Подбор оптимальных условий для выделения представителей кишечной микробиоты, основанный на методах культуромики, важен для обнаружения максимального спектра микроорганизмов, особенно из числа труднокультивируемых облигатных анаэробов, при исследовании микробиоты различных биотопов человека. Использование специализированных питательных сред для накопления биомассы таких микроорганизмов открывает перспективы для конструирования новых высокоэффективных пробиотиков на основе продуцентов регуляторных метаболитов, в т.ч. и КЦЖК, применение которых не только способствует усилению барьерной функции кишечного эпителия, но и обеспечит коррекцию состояния дисбиоза, возникающего у человека после перенесенных заболеваний, и восстановление кишечной микробиоты.

### Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава России «Разработка комплексного подхода к диагностике и коррекции дисбиотических нарушений микробиоты кишечника, спровоцированных антибактериальной терапией, у новорожденных детей» (124020600025-2).

### Financial support

The work was carried out within the framework of the state task of the Ministry of Health of Russia "Development of an integrated approach to the diagnosis and correction of dysbiotic disorders of the intestinal microbiota provoked by antibacterial therapy in newborns" (124020600025-2).

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

## Литература / References

- Legg K. Gut Reactions: Microbes in the Digestive Tract Influence COVID Severity. 2021.
- Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JL. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005 Mar 25;307(5717):1915-20. DOI: 10.1126/science.1104816
- Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*. 2017 May 16;474(11):1823-1836. DOI: 10.1042/BCJ20160510
- Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006 Jun 2;312(5778):1355-9. DOI: 10.1126/science.1124234
- Najmi N, Megantara I, Andriani L, Goenawan H, Lesmana R. Importance of gut microbiome regulation for the prevention and recovery process after SARS-CoV-2 respiratory viral infection (Review). *Biomed Rep*. 2022 Apr;16(4):25. DOI: 10.3892/br.2022.1508
- Xu R, Lu R, Zhang T, Wu Q, Cai W, Han X, et al. Temporal association between human upper respiratory and gut bacterial microbiomes during the course of COVID-19 in adults. *Commun Biol*. 2021 Feb 18;4(1):240. DOI: 10.1038/s42003-021-01796-w
- Rajput S, Paliwal D, Naithani M, Kothari A, Meena K, Rana S. COVID-19 and Gut Microbiota: A Potential Connection. *Indian J Clin Biochem*. 2021 Jul;36(3):266-277. DOI: 10.1007/s12291-020-00948-9
- Hills RD Jr, Pontefract BA, Mishcon HR, Black CA, Sutton SC, Theberge CR. Gut Microbiome: Profound Implications for Diet and Disease. *Nutrients*. 2019 Jul 16;11(7):1613. DOI: 10.3390/nu11071613
- Lakshmy Ramakrishnan. Considering the link between microbiota health and COVID-19 severity. *Nature*, 2022.
- Diakite A, Dubourg G, Dione N, Afouda P, Bellali S, Ngom I, et al. Optimization and standardization of the culturomics technique for human microbiome exploration. *Sci Rep*. 2020 Jun 15;10(1):9674. DOI: 10.1038/s41598-020-66738-8
- Su Q, Lau RI, Liu Q, Chan FKL, Ng SC. Post-acute COVID-19 syndrome and gut dysbiosis linger beyond 1 year after SARS-CoV-2 clearance. *Gut*. 2023 Jun;72(6):1230-1232. DOI: 10.1136/gutjnl-2022-328319
- Chang Y, Hou F, Pan Z, Huang Z, Han N, Bin L, et al. Optimization of Culturomics Strategy in Human Fecal Samples. *Front Microbiol*. 2019 Dec 17;10:2891. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02891
- Hu W, Gao W, Liu Z, Fang Z, Zhao J, Zhang H, et al. Biodiversity and Physiological Characteristics of Novel Faecalibacterium prausnitzii Strains Isolated from Human Feces. *Microorganisms*. 2022 Jan 26;10(2):297. DOI: 10.3390/microorganisms10020297
- Available at: [https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium110.pdf](https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium110.pdf)
- Available at: [https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium78.pdf](https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium78.pdf)
- Available at: [https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium1611.pdf](https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium1611.pdf)
- Available at: [https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium58.pdf](https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium58.pdf)

### Информация о соавторах:

Исаева Елена Леонидовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии отдела молекулярной микробиологии и биоинформатики Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России

Муравьева Вера Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии отдела молекулярной микробиологии и биоинформатики Института микробиологии, антимикробной терапии и ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России

Жигалова Ксения Николаевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии отдела молекулярной микробиологии и биоинформатики Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России

Измюмов Роман Викторович, научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии отдела молекулярной микробиологии и биоинформатики Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России

Нечаева Ольга Викторовна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии отдела молекулярной микробиологии и биоинформатики Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России

Припутневич Татьяна Валерьевна, чл.-корр. РАН, доктор медицинских наук, директор Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова» Минздрава России

**Information about co-authors:**

Elena L. Isaeva, PhD, MD, Senior Researcher, Laboratory of molecular microbiology, Department of molecular microbiology and bioinformatics, Microbiology, Antimicrobial therapy and Epidemiology Institute, Academician V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Vera V. Muravieva, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, Laboratory of molecular microbiology, Department of molecular microbiology and bioinformatics, Microbiology, Antimicrobial therapy and Epidemiology Institute, Academician V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Ksenia N. Zhigalova, Researcher, Laboratory of molecular microbiology, Department of molecular microbiology and bioinformatics, Microbiology, Antimicrobial therapy and Epidemiology Institute, Academician V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Roman V. Izyumov, Researcher, Laboratory of molecular microbiology, Department of molecular microbiology and bioinformatics, Microbiology, Antimicrobial therapy and Epidemiology Institute, Academician V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

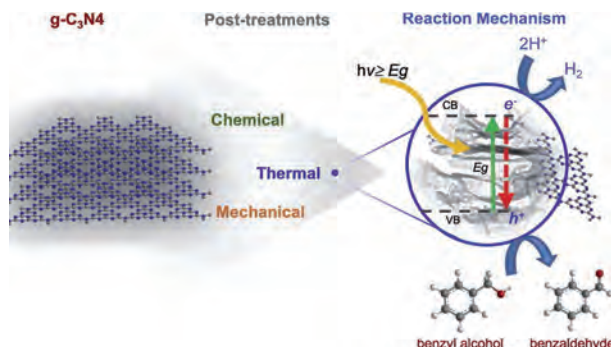
Olga V. Nechaeva, PhD, DSc (Biological Sciences), Senior Researcher, Laboratory of molecular microbiology, Department of molecular microbiology and bioinformatics, Microbiology, Antimicrobial therapy and Epidemiology Institute, Academician V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Tatiana V. Pripitnevich, Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, Director of Microbiology, Antimicrobial therapy and Epidemiology Institute, Academician V.I.Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

**НОВОСТИ НАУКИ**

**Проблемы обработки, упаковки и безопасности пищевых продуктов**

В течение последних нескольких десятилетий нанотехнологии привлекали все большее внимание как потенциально ценная технология, которая значительно повлияла на пищевую промышленность. Нанотехнологии помогают улучшить свойства материалов и конструкций, используемых в различных областях, таких как сельское хозяйство, продукты питания, фармацевтика и так далее. Применение нанотехнологий на рынке продуктов питания включает инкапсулирование и распределение материалов в определенных местах, улучшение вкуса, введение антибактериальных наночастиц в пищу, улучшение длительного хранения, обнаружение загрязняющих веществ, улучшенные условия хранения, обнаружение, идентификацию, а также осведомленность потребителей. Маркировка продуктов питания нано-штрих-кодами помогает обеспечить их безопасность, а также может использоваться для отслеживания их распространения. В этой обзорной статье обсуждаются современные достижения в области нанотехнологий, а также их применение в области пищевых технологий, упаковки пищевых продуктов, продовольственной безопасности, увеличения срока службы пищевых продуктов и т.д. Дается подробное описание различных путей синтеза наноматериалов, которые. Это химические, физические и биологические методы. Нанотехнологии в области упаковки пищевых продуктов быстро совершенствуются, и в будущем открываются большие возможности для дальнейшего совершенствования за счет разработки новых наноматериалов и наносенсоров.



Singh R, et al.

*Future of Nanotechnology in Food Industry: Challenges in Processing, Packaging, and Food Safety. Global Challenges. 2023 Feb;2200209. DOI: 10.1002/gch2.202200209*

# Опыт изоляции *Coxiella burnetii* из сывороток крови больных с использованием клеточных линий и биопробных животных

В.В.Евдокимова, Д.И.Симакова, Л.П.Алексеева, Д.А.Левченко, М.Г.Мелоян, Е.Н.Сокиркина

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

**Цель исследования** – оценить возможность выделения жизнеспособных бактерий *Coxiella burnetii* из сывороток крови больных острой лихорадкой Ку с использованием клеточных линий и биопробных животных.

В исследование взяты сыворотки крови больных, хранившиеся при -80°C. Изоляцию возбудителя лихорадки Ку проводили путем инокуляции сыворотки в культуру клеток Vero E6, Hep-2 и введением в биопробных животных (белые мыши, морские свинки) с последующими многократными пассажами *in vivo* и *in vitro*. Для мониторинга роста *C. burnetii* в культуре клеток и обнаружения ДНК возбудителя в суспензии органов зараженных животных применяли метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В данном исследовании была изучена возможность применения культуры клеток для выделения и поддержания непрерывного роста *C. burnetii*. Изоляция последней была осуществлена из двух образцов сывороток крови с исходными значениями Ct 24,63 и Ct 28,04 в ПЦР-анализе. Культивирование возбудителя на клеточных линиях приводило к его элиминации через 3–4 пассажа, длительность которых составляла 7 дней. Пассирование возбудителя в биопробных животных с последующей инокуляцией инфекционного материала (суспензия перитонеальных макрофагов, легких, селезенки) в культуру клеток способствовало поддержанию жизнеспособности коксиелл более длительные сроки. Результаты эксперимента показывают, что стандартные образцы сыворотки, взятые у пациентов с острой лихорадкой Ку, являются ценным источником новых изолятов *C. burnetii*, причем для сохранения жизнеспособности микроорганизма не требуется особой обработки образцов.

**Ключевые слова:** лихорадка Ку, *Coxiella burnetii*, культура клеток, Vero E6, Hep-2, пассаж, макрофаги, биопробные животные

**Для цитирования:** Евдокимова В.В., Симакова Д.И., Алексеева Л.П., Левченко Д.А., Мелоян М.Г., Сокиркина Е.Н. Опыт изоляции *Coxiella burnetii* из сывороток крови больных с использованием клеточных линий и биопробных животных. Бактериология. 2024; 9(1): 63–71. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-63-71

## Experience with isolation of *Coxiella burnetii* from patient sera using cell lines and bioassay animals

V.V.Evdokimova, D.I.Simakova, L.P.Alekseeva, D.A.Levchenko, M.G.Meloyan, E.N.Sokirkinina

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

**Aim.** To evaluate the possibility of isolating viable *Coxiella burnetii* from the blood sera of patients with acute Q fever using cell lines and bioassay animals.

Blood sera from patients stored at -80°C were used in the study. Isolation of the causative agent of Q fever was performed by inoculation of serum into Vero E6, Hep-2 cell culture and injection into bioassay animals (white mice, guinea pigs) with subsequent multiple passages *in vivo* and *in vitro*. PCR was used to monitor the growth of *C. burnetii* in cell culture and to detect the pathogen DNA in organ suspension of infected animals.

In this study, the potential use of cell culture to isolate and maintain continuous growth of *C. burnetii* was investigated. Isolation of the latter was performed from 2 serum samples with initial Ct values of 24.63 and Ct 28.04 in a PCR assay. Cultivation of the pathogen on cell lines resulted in its elimination after 3–4 passages, the duration of which was 7 days. Passage of the pathogen in bioassay animals with subsequent inoculation of infectious material (suspension of peritoneal macrophages, lungs, spleen) into cell culture contributed to the maintenance of coxiella viability for longer periods. The experimental results show that standard serum samples taken from patients with acute Q fever are a valuable source of new isolates of *C. burnetii*, and no special sample processing is required to maintain the viability of the microorganism.

**Key words:** Q-fever, *Coxiella burnetii*, cell culture, Vero E6, Hep-2, passaging, macrophages, bioassay animals

**For citation:** Evdokimova V.V., Simakova D.I., Alekseeva L.P., Levchenko D.A., Meloyan M.G., Sokirkinina E.N. Experience with isolation of *Coxiella burnetii* from patient sera using cell lines and bioassay animals. Bacteriology. 2024; 9(1): 63–71. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-63-71

### Для корреспонденции:

Евдокимова Вероника Вячеславовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории диагностических препаратов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40

Телефон: (863) 240-91-13

E-mail: evdokimova\_vv@antiplague.ru

Статья поступила 10.01.2024, принята к печати 29.03.2024

### For correspondence:

Veronika V. Evdokimova, PhD in Biological Sciences, Researcher, Laboratory of diagnostic preparations, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor

Address: 117/40 M.Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation

Phone: (863) 240-91-13

E-mail: evdokimova\_vv@antiplague.ru

The article was received 10.01.2024, accepted for publication 29.03.2024



**C***oxiella burnetii* – облигатный внутриклеточный бактериальный патоген, вызывающий зоонозное заболевание – лихорадку Ку. Заражение человека обычно происходит от инфицированных животных аспирационным и контактным путем. Домашние жвачные животные, такие как овцы, козы и крупный рогатый скот, считаются основными источниками человеческой инфекции в большинстве регионов мира [1, 2]. Однако *C. burnetii* были обнаружены у широкого спектра видов животных и птиц [3], в т.ч. среди тихоокеанских млекопитающих [4–6].

Заболееваемость выше среди людей, контактирующих с животными, в частности у ветеринаров и работников скотобоен, поскольку инфицированные животные распространяют возбудителя через свои фекалии, мочу, молоко [2, 7, 8]. Локализация патогена в вымени крупного рогатого скота является критическим фактором для выделения бактерий в молоко, но в настоящее время неизвестно, какие типы клеток способствуют персистенции и репликации *C. burnetii* в молочной железе [9]. Большое количество микроорганизмов также содержат амниотическая жидкость и плацента, а во время аборта может выделяться до  $10^9$  клеток *C. burnetii* на 1 г плаценты [10]. Однако прямой контакт с инфицированными животными не является обязательным условием для заражения. Благодаря своей высокой устойчивости возбудитель может сохраняться в течение нескольких месяцев в высушенных продуктах жизнедеятельности и распространяться ветром [7, 11].

Один из наиболее вирулентных эталонных штаммов *C. burnetii* (штамм RSA 493 / Nine Mile I) [12] был выделен от морской свинки, на которой питались собранные в полевых условиях древесные клещи Скалистых гор *Dermacentor andersoni*, что позволяет предположить передачу инфекции также через укусы клещей [3, 13–15]. Клещи заражаются при сосании крови инфицированных животных, что неоднократно доказано в эксперименте, и длительно сохраняют в себе возбудителя [16]. Коксии интенсивно размножаются в клетках эпителия кишечника, выделяются во внешнюю среду с испражнениями клещей, их коксальной жидкостью и слюнным секретом [17]. В последнее десятилетие во многих регионах, в т.ч. в Северной Евразии, у клещей разных таксономических групп обнаруживаются *Coxiella*-подобные организмы. Часть из них являются истинными эндосимбионтами клещей, которые не могут выживать в клетках теплокровных организмов, что, напротив, характерно для патогенного вида *C. burnetii* [18].

Коксии имеет две антигенные фазы: организмы фазы I, выделенные из естественных источников инфекции (клещи, животные, больные люди), чрезвычайно вирулентны. *C. burnetii* фазы II наблюдаются только в лабораторных условиях после длительного культивирования в системах с отсутствием иммунной компетентности и представляют собой бактерии с усеченным липополисахаридом. Необратимые мутации приводят к сильному ослаблению вирулентности *in vivo* [19, 20], поскольку *C. burnetii* теряет способность образовывать I антиген. Вирулентные свойства восстанавливаются после пассажей возбудителя через организм биопробных животных. У больных острой лихорадкой Ку преобладают антитела к антигену *C. burnetii* фазы II; антитела к антигену фазы I преобладают при формировании хронического течения инфекции [16].

Основными проявлениями острой лихорадки Ку у человека являются гриппоподобное заболевание, пневмония и гепатит, в то время как хроническая форма (2–5% от общего числа случаев заболевания) протекает в основном в виде инфекционного эндокардита [8, 21, 22]. Диагностика эндокардита затруднена невозможностью культивирования *C. burnetii* с использованием обычных сред. Как строго облигатную внутриклеточную бактерию, ее можно культивировать только в живых клеточных линиях, куриных эмбрионах и в организме лабораторных животных (морских свинок, белых мышей), но эти методы применимы только в лабораториях 3-го уровня биобезопасности. Таким образом, диагноз хронической лихорадки Ку основывается на серологическом тестировании парных сывороток, характеризующихся повышением титров антител к антигену I фазы [23].

Для лабораторной диагностики случаев острог коксиеллеза исследование сыворотки крови больного целесообразно проводить в первые дни лихорадочного периода болезни. Отрицательные результаты серологических реакций или низкие титры антител к коксиеллам II фазы являются основанием для проведения повторного исследования сыворотки крови, полученной от больного, через 7–10 дней после забора первой пробы и сравнения результатов одновременного исследования двух проб. Появление антител к коксиеллам Бернета II фазы или нарастание титров этих антител во второй пробе в 4 раза и более свидетельствуют о коксиеллезной природе заболевания [24].

В острой фазе заболевания *C. burnetii* может быть обнаружена методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в крови и сыворотке до 17 дней после появления клинических признаков и симптомов [25, 26]. Положительный результат ПЦР на наличие в крови ДНК возбудителя почти всегда коррелирует с острой стадией лихорадки Ку, но реакция быстро становится отрицательной по мере нарастания специфических антител [26, 27]. Поскольку ПЦР не может дифференцировать жизнеспособные и нежизнеспособные бактерии, существует необходимость в применении биологического и культурального методов. Инокуляция образцов пациентов в клеточные культуры, зарекомендовавшая себя как способ накопления *C. burnetii* [28], позволяет получить жизнеспособные штаммы коксиелл для проведения дальнейших исследований возбудителя.

Традиционно для выделения и накопления большого количества *C. burnetii* и других риккетсий используются эмбрионы куриных яиц. Успехи в области клеточных культур позволили выращивать внутриклеточные бактерии в культуральных флаконах или многолуночных планшетах, содержащих монослой эукариотических клеток-хозяев. Выделение возбудителя в культуре клеток более безопасно, чем размножение *C. burnetii* в куриных эмбрионах, но имеет переменный процент успеха при выделении штаммов с различной вирулентностью [29, 30]. M.J.Roman et al. наблюдали инфицирование культуры клеток в течение более 2 лет без добавления новых клеток. Данный факт объясняется тем, что инфекция обычно не разрушает клеточную линию и инфицированные клетки имеют такую же прогрессию клеточного цикла, как и неинфицированные: происходит асимметричное деление, в результате которого образуется одна инфицированная и одна неинфицированная дочерняя клетка [31]. Выживание инфициро-

ванных клеток является важным для поддержания хронической коксиеллезной инфекции. Коксиелла может продлевать жизнеспособность клетки-хозяина двумя способами: она активно ингибирует апоптотический сигнальный каскад и индуцирует способствующие выживанию факторы [32].

Макрофаги считаются наиболее важными клетками-хозяевами для *C. burnetii* [8]. В этих клетках крупного рогатого скота и человека *C. burnetii* реплицируется в паразитофорных вакуолях с лизосомальными кислотными характеристиками, где кислый pH активирует метаболизм *C. burnetii* и инициирует репликацию микроорганизма [33]. Макрофаги также являются первым барьером врожденной иммунной системы, защищающим организм от патогенов. Во время ранней фазы инфекции, т.е. в течение первых часов от начала заболевания, *C. burnetii* индуцирует быструю экспрессию провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-1, интерлейкин-12 и фактор некроза опухоли- $\alpha$  в бычьих [33] и мышинных макрофагах [34].

В мире существует мало изолятов *C. burnetii* из-за трудностей, связанных с выделением микроорганизма, и дефицита подходящих для этого образцов, в т.ч. от пациентов с острой лихорадкой Ку.

На территории Ростовской области после периода длительного эпидемиологического благополучия в 2022 г. было выявлено 27 случаев лихорадки Ку, а с января по август 2023 г. – девять. В 2022 г. заболевшие выявлены в г. Сальск (37,0%) и трех административных районах, расположенных в сухостепной зоне юго-востока области: Ремонтненский – 29,6%, Сальский – 29,6%, Целинский – 3,8%, население которых занимается в основном скотоводством и зерноводством. В 2023 г. отмечено расширение нозоареала за счет регистрации спорадической заболеваемости в Дубовском районе, который также относится к природно-сельскохозяйственной зоне с развитым скотоводством, в т.ч. овцеводством [35].

**Цель** нашей работы заключалась в оценке возможности выделения жизнеспособной *C. burnetii* из сывороток крови больных острой лихорадкой Ку с использованием клеточных линий и биопробных животных.

## Материалы и методы

**Образцы сывороток.** Образцы сывороток крови двух пациентов (№63, №64) с подтвержденным диагнозом «Лихорадка Ку», взятые на 7–8-й день от начала появления клинических симптомов, поступившие из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» Роспотребнадзора.

**Клеточные линии.** В работе использовали клеточную линию Vero E6 (африканская зеленая мартышка, почка, морфология фибробластоподобная) и Her-2 (человек, карцинома гортани, морфология эпителиоподобная). Клеточные линии культивировали до слияния (до конфлюэнтности 80%) при температуре 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub>.

**Биопробные животные.** Использовали беспородных белых мышей массой 12–14 г. Антиген биопробным животным вводили внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл. После эвтаназии в асептических условиях производили вскрытие и отбор биоматериала (перитонеальный лаваж, легкие, селезенка). Селезенку использовали для получения мазков-отпе-

чатков, окрашенных по Романовскому–Гимзе [19]. Суспензии перитонеальных макрофагов и гомогенаты легких исследовали методом ПЦР для выявления ДНК *C. burnetii*. Эти же образцы являлись материалом для заражения новой пары животных (следующий пассаж) и инокуляции в культуру клеток. Оставшийся материал после добавления сыворотки плодов коровы (СПК) замораживали при температуре -80°C. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с этическими нормами, изложенными в Директивах Европейского союза 2010/63/EU [36]. Все работы с животными были одобрены Комиссией по биоэтике (протокол №13 заседания от 30.11.2022).

**Полимеразная цепная реакция.** Выделение ДНК *C. burnetii* из образцов биологического материала и ПЦР проводили коммерческими наборами «РИБО-преп» и «АмплиСенс® *Coxiella burnetii*-FL» (ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора). Результат считался положительным при значении Ct < 39. В качестве отрицательного контроля в ПЦР использовали чистую культуру Vero E6 и суспензии органов здоровых белых мышей.

**Микроскопия.** Наблюдение за культурой клеток проводили в инвертированном микроскопе Nikon Eclips TS-100 (Nikon, Япония) в режиме фазового контраста. Мазки-отпечатки органов инфицированных животных фиксировали этиловым спиртом в течение 30 мин, окрашивали по Романовскому–Гимзе [19] и изучали микроскопированием в проходящем свете Nikon Eclipse E200-F (Nikon, Япония) с иммерсионной системой при увеличении 10 × 100.

**Питательные среды и реактивы.** Для выращивания клеточных линий *in vitro* использовали жидкие питательные среды RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen, США) и DMEM (Gibco, Invitrogen, США), в которые добавляли 10% термоинактивированной сыворотки плода коровы (ООО «БиолоТ», Россия), 2 мМ глутамин (PanReac Applichem, Германия). Для пассирования возбудителя лихорадки Ку на клеточных линиях использовали среду RPMI-1640 и DMEM без антибиотиков с содержанием 2–5% СПК, 2мМ глутамин.

**Оборудование и расходные материалы.** Клеточные линии культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе MCO-19AIC (Sanyo, Япония). Пассирование возбудителя лихорадки Ку на культуре клеток проводили в пластиковых флаконах T25, 6- и 12-луночных планшетах в CO<sub>2</sub>-инкубаторе Innova CO-48 (Newbrunswick Scientific, Великобритания) с 5%-м содержанием углекислого газа при температуре 36°C.

**Биологическая безопасность.** Все работы проводились в микробиологическом боксе III класса с учетом требований СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Протоколы заражения культуры клеток и биопробных животных. Исследуемые образцы сывороток крови больных хранились при -80°C. Перед заражением культуры клеток и биопробных животных проверяли наличие специфической ДНК *C. burnetii* в исследуемых сыворотках методом ПЦР. Установлено, что Ct в сыворотке №63 составил 24,63; в сыворотке №64 – 28,04.

**Протокол №1.** Инокуляция образцов сыворотки крови в культуру клеток Vero E6: 100 мкл сыворотки вносили в подготовленный конфлюэнтный (не менее 80% слияния) монослой клеток в лунки 12-луночного планшета, срок одного

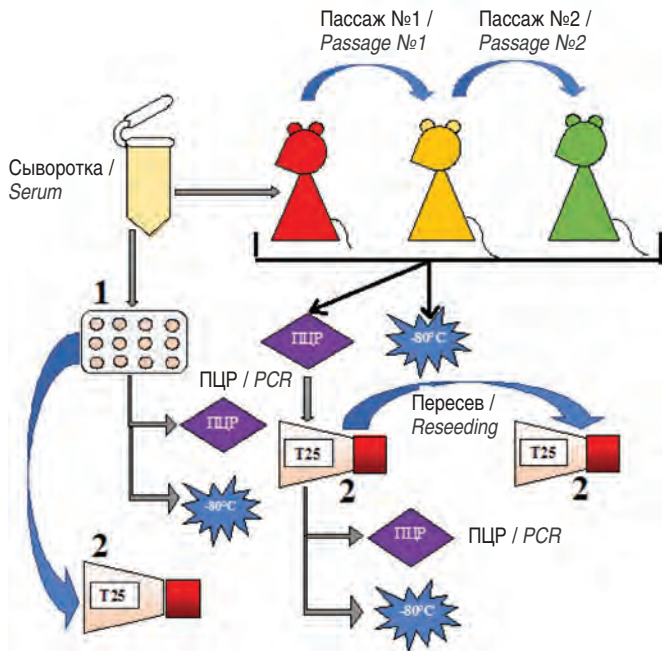


Рис. 1. Схема эксперимента по заражению культуры клеток и биопробных животных (белые мыши) материалом, содержащим ДНК *C. burnetii*: 1 – 12-луночный планшет с монослоем клеток Vero E6 или Hep-2, 2 – культуральный флакон T25 с монослоем клеток Vero E6 или Hep-2.

Fig. 1. Scheme of the experiment on infection of cell culture and bioassay animals (white mice) with material containing *C. burnetii* DNA: 1 – 12-well plate with a monolayer of Vero E6 or Hep-2 cells, 2 – T25 culture flask with a monolayer of Vero E6 cells or Hep-2.

пассажа – 7 дней. Начиная с 5-го пассажа культивирование проводили в культуральных флаконах T25. По истечении срока пассажа из лунок/флаконов отбирали культуральную жидкость для проведения ПЦР и 100 мкл переносили в лунку с новым монослоем клеток (следующий пассаж). Дальнейшее культивирование прекращали, если в двух пассажах подряд в ПЦР был получен отрицательный результат. Оставшиеся в культуральной среде клетки механически снимали со дна лунок, суспензию замораживали при -80°C, предварительно добавив СПК в качестве криопротектора. Всего было проведено 6 пассажей (42 дня) для сыворотки №63 и 8 (56 дней) – для сыворотки №64.

**Протокол №2.** Заражение биопробных животных: 100 мкл сыворотки крови (№63, №64) доводили стерильным физиологическим раствором до объема 0,5 мл и вводили внутрибрюшинно биопробным животным (по 2 мыши на каждую пробу). По истечении 14 дней (1-й пассаж) проводили эвтаназию 1 животного из каждой пары. В асептических условиях производили вскрытие и отбор органов (перитонеальные макрофаги, легкие, селезенка) для проведения ПЦР и заражения следующей пары животных. Оставшийся материал

после добавления СПК замораживали при -80°C. Второе опытное животное подвергали эвтаназии через 21 день от момента заражения, суспензии органов использовали для проведения ПЦР. Длительность всех последующих пассажей составляла 14 дней, по истечении которых производили эвтаназию и вскрытие биопробных животных: готовили суспензии макрофагов и легких от двух мышей, зараженных одной пробой, из общего объема отбирали аликвоты для обнаружения ДНК *C. burnetii* методом ПЦР, заражения новой пары животных (следующий пассаж), инокуляции в культуру клеток. Общая продолжительность пассажей в протоколе №2 составляла 112 дней.

**Протокол №3.** Заражение клеточных линий материалом, полученным от биопробных животных (белых мышей): суспензию перитонеальных макрофагов, клеток легкого и селезенки вносили во флаконы T25 на предварительно подготовленный конфлюэнтный монослой клеток Vero E6, Hep-2. В течение всего срока пассажа отбирали аликвоты культуральной жидкости через разные промежутки времени (от 7 до 28 дней) для ПЦР-анализа и замораживания. Культуры с положительным результатом в ПЦР поддерживались в исходных флаконах со сменой среды раз в неделю (1/3–1/2 от общего объема ростовой среды). Через 6–8 нед. проводили пересев содержимого исходных флаконов на новый монослой эукариотических клеток (2-й пассаж). На рис. 1 представлена схема экспериментов по протоколам №№ 1, 2, 3.

## Результаты исследования и их обсуждение

Алгоритм проведенных исследований обусловлен особенностями внутриклеточного жизненного цикла и, как следствие, значительными ограничениями в лабораторной работе с необходимостью создания точно документированных протоколов заражения *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, отдельные штаммы и изоляты в значительной мере различаются по степени вирулентности в модельных экспериментах. В ходе настоящего исследования было применено несколько протоколов заражения моделей *in vitro* и *in vivo* клиническим материалом (см. раздел Материалы и методы).

Как показали результаты исследования (табл. 1), при внесении клинического материала от больных в культуру клеток Vero E6 регистрировали увеличение количества специфической ДНК *C. burnetii* в лунке с сывороткой №63 в конце 3-го пассажа (через 21 день от начала культивирования), затем ее снижение до отрицательного значения. Что касается сыворотки №64, то в аналогичных условиях не наблюдали повышения показателей Ct в ПЦР.

В то же время при заражении белых мышей клиническим материалом от больных (сыворотка крови №64) отмечали увеличение количества специфической ДНК *C. burnetii* в су-

Таблица 1. Результаты культивирования сыворотки больного, содержащей ДНК *C. burnetii*, на клетках Vero E6  
 Table 1. Results of culturing patient serum containing *C. burnetii* DNA on Vero E6 cells

Клинический материал / Clinical material	№ пассажа/продолжительность в днях, значение Ct в ПЦР / Passage number/duration in days, Ct value in PCR							
	1/7 д. days	2/7 д. days	3/7 д. days	4/7 д. days	5/7 д. days	6/7 д. days	7/7 д. days	8/7 д. days
Сыворотка / Serum №63 (Ct 24,63)	34,6	33,34	19,5	26,5	Отр. / neg	Отр. / neg	-	-
Сыворотка №64 / (Ct 28,04)	29,7	30,24	32,6	36,3	Отр. / neg	35,9	Отр. / neg	Отр. / neg

спензии органов при пассаже длительностью 14 дней. Продление сроков пассажа до 21 дня приводило к снижению количества специфической ДНК, поэтому временной интервал последующих пассажей составлял 14 дней (табл. 2). На рис. 2 представлены фотографии окрашенного по Романовскому–Гимзе мазка-отпечатка селезенки белой мыши от пассажа №3, в органах которой методом ПЦР выявлена ДНК *C. burnetii* (Ct 17,1 и 18,5): визуализируется скопление микроорганизмов кокковидной формы, окрашенных в красно-фиолетовый цвет, на фоне голубой цитоплазмы разорванной клетки-хозяина.

Далее инфекционный материал переносили в культуру клеток для дальнейшего накопления ДНК *C. burnetii* на культуре клеток. Поскольку *C. burnetii* является облигатным внутриклеточным патогеном, инокуляцию в культуру клеток можно охарактеризовать только косвенными методами подсчета. Однократное обнаружение ДНК *C. burnetii* методом ПЦР не является убедительным доказательством присутствия жизнеспособных бактерий, особенно если Ct имеет высокие значения (35–39). Однако повторное обнаружение, сопровождающееся снижением значения Ct, свидетельствует об увеличении числа копий генома *C. burnetii* и, следовательно, является убедительным показателем роста бактерий [37].

Как показали результаты наших экспериментов (табл. 3), накопление ДНК *C. burnetii* зависело от исходного значения Ct в инфекционном материале. При Ct > 30 (суспензия клеток легкого) не происходило увеличения количества специфической ДНК и пассирование возбудителя в течение 42 дней привело к отрицательному результату. По-видимому, исходная доза *C. burnetii* не была оптимальной для заражения клеточной линии. При внесении в культуру клеток инфекционного материала с исходным значением Ct 20–30 (флакон №2) отмечено сохранение показателей количества специфической ДНК на протяжении 49 дней (со сменой ростовой среды раз в 7 дней) на уровне не ниже Ct 26, без дальнейшего повышения. Суспензию макрофагов, содержащую ДНК *C. burnetii* в пределах значений Ct 15–20 (флакон №3), культивировали в клетках Vero E6 в течение 104 дней (с одним пересевом). Установлено, что в течение первых 14 дней культивирования наблюдался прирост специфической ДНК до Ct 17,3–17,5, затем ее количество снижалось до Ct 20,8 через 48 дней и продолжалось уменьшение до значения Ct 27,8 после

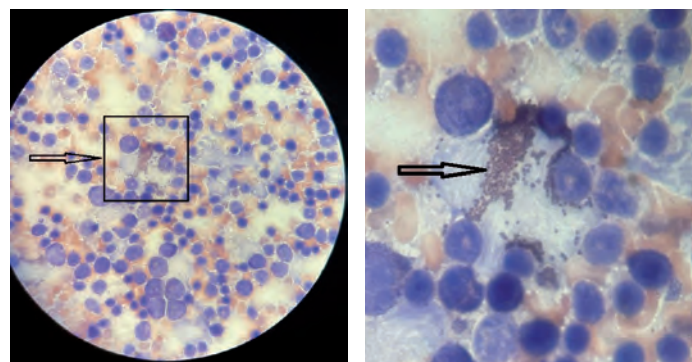


Рис. 2. Мазки-отпечатки органов биопробных животных (белые мыши, селезенка), окрашивание по Романовскому–Гимзе, увеличение 10 × 100.

Fig. 2. Imprint smears of organs of bioassay animals (white mice, spleen), Romanovsky–Giemsa staining, magnification 10 × 100.

пересева содержимого флакона на новый монослой клеток (2-й пассаж). Суспензию клеток легкого, содержащую ДНК *C. burnetii* Ct 10-15 (флаконы №4, №5), культивировали в клетках Vero E6 и Hep-2 118 дней, регистрируя специфическую ДНК в диапазоне Ct 16-21 в течение 48 дней, а после пересева и последующего культивирования значения Ct были в пределах 21-27. Накопление специфической ДНК также установили при заражении культуры Vero E6 суспензией клеток селезенки от биопробного животного (флакон №6): от Ct 20 за первые 12 дней культивирования до Ct 15,7 через 106 дней роста.

Таким образом, в нашем опыте при инокуляции в культуру клеток суспензии органов биопробных животных (табл. 3, флакон 3) мы наблюдали увеличение числа копий генома *C. burnetii* в первые 14 дней культивирования в том случае, если исходный материал был со значением Ct < 20. При этом необходимо учитывать разведение образца в 6 раз при его посеве во флакон с культурой клеток. Увеличение длительности культивирования с 7 до 28 дней без смены ростовой среды не приводило к повышению количества ДНК возбудителя (флакон №7). Существенной разницы в накоплении ДНК *C. burnetii* на двух разных клеточных линиях отмечено не было. Однако клетки Vero E6 являются более оптимальной моделью, т.к. при значительном увеличении толщины монослоя они не открепляются от поверхности пластика, что позволяет длительно культивировать *C. burnetii* без пересева на

Таблица 2. Результаты обнаружения ДНК *C. burnetii* в суспензии органов зараженных белых мышей методом ПЦР  
 Table 2. Results of detection of *C. burnetii* DNA in organ suspensions of infected white mice by PCR

Клинический материал / Clinical material	№ пассажа (продолжительность), значение Ct в ПЦР / Passage number (duration), Ct value in PCR																Кол-во дней / Number of days			
	Пассаж 1 (14 дней) / Passage 1 (14 days)	Пассаж 1а (21 день) / Passage 1a (21 day)	Пассаж 2 (14 дней) / Passage 2 (14 days)	Пассаж 3 (14 дней) / Passage 3 (14 days)	Пассаж 4 (14 дней) / Passage 4 (14 days)	Пассаж 5 (14 дней) / Passage 5 (14 days)	Пассаж 6 (14 дней) / Passage 6 (14 days)	Пассаж 7 (14 дней) / Passage 7 (14 days)	Пассаж 8 (14 дней) / Passage 8 (14 days)	клетки легкого / lung cells	макрофаги / macrophages	клетки легкого / lung cells	макрофаги / macrophages	клетки легкого / lung cells	макрофаги / macrophages	клетки легкого / lung cells		макрофаги / macrophages		
Сыворотка / Serum №63 (Ct 24,63)	28,9	Отр. neg	Отр. neg	Отр. neg	33,5	Отр. neg	30,5	34,5	Отр. neg	Отр. neg	Отр. neg	34,6	Отр. neg	Отр. neg	Отр. neg	Отр. neg	Отр. neg	-	-	98
Сыворотка / Serum №64 (Ct 28,04)	21,6	17,1	35,3	27,1	12,5	19,1	18,5	17,1	24,3	23,4	21,2	19,1	21,7	22,5	18,4	18,2	21,1	20,1	112	

Таблица 3. Результаты культивирования материала от белых мышей, содержащего *C. burnetii*, на клетках Vero E6 и Hep-2  
 Table 3. Results of culturing material from white mice containing *C. burnetii* on Vero E6 and Hep-2 cells

Материал для заражения / клеточная линия, Ct / Infection material/ cell line, Ct	№ тестирования /дни, значение Ct в ПЦР / Test No./days, Ct value in PCR											Кол-во дней пассажа / Number of days of passage	
	1/7 д. / days	2/7 д. / days	3/7 д. / days	4/7 д. / days	5/7 д. / days	6/7 д. / days	-	-	-	-	-		
Флакон №1, сусп. кл. легкого/Нер-2, Ct 33,5 / Flask No1, lung cells susp./ Hep-2, Ct 33.5	1/7 д. / days	2/7 д. / days	3/7 д. / days	4/7 д. / days	5/7 д. / days	6/7 д. / days	-	-	-	-	-	-	42
	32,3	35,4	Отр neg	35,99	Отр neg	Отр neg	-	-	-	-	-	-	
Флакон №2, сусп. макрофагов/Vero E6, Ct 27,1 / Flask No2, macrophages susp. /Vero E6, Ct 27.1	1/7 д. / days	2/7 д. / days	3/7 д. / days	4/7 д. / days	5/7 д. / days	6/7 д. / days	7/7 д. / days, пересев reseeding	8/7 д. / days	-	-	-	-	49
	28,1	30,38	30,7	35,09	32,94	31,4	30,3	Отр neg	-	-	-	-	
Флакон №3, сусп. макрофагов/Vero E6, Ct 19,1 / Flask No3, macrophages susp. /Vero E6, Ct 19.1	1/7 д. / days	2/7 д. / days	3/7 д. / days	4/7 д. / days	5/10 д. / days	6/10 д. / days, пересев reseeding	7/7 д. / days	8/7 д. / days	9/7 д. / days	10/14 д. / days	11/21 д. / days	-	104
	17,3	17,5	21,8	21,48	19,2	20,8	26,8	27,1	25,1	23,6	27,8	-	
Флакон №4, сусп. кл. легкого/Vero E6, Ct 12,5 / Flask No4, lung cells susp./ Vero E6, Ct 12.5	1/7 д. / days	2/7 д. / days	3/7 д. / days	4/7 д. / days	5/10 д. / days	6/10 д. / days, пересев reseeding	7/7 д. / days	8/7 д. / days	9/7 д. / days	10/14 д. / days	11/21 д. / days	12/14 д. / days	118
	16,6	16,4	21,82	21,4	18,5	21,7	23,8	27,4	24,4	22,4	25,4	23,93	
Флакон №5, сусп. кл. легкого/Нер-2, Ct 12,5 / Flask No5, lung cells susp./ Hep-2, Ct 12.5	1/7 д. / days	2/7 д. / days	3/7 д. / days	4/7 д. / days	5/10 д. / days	6/10 д. / days, пересев reseeding	7/7 д. / days	8/7 д. / days	9/7 д. / days	10/14 д. / days	11/21 д. / days	12/14 д. / days	118
	17,6	17,4	19,61	20,31	19,3	21,0	25,52	24,2	23,3	21,3	26,3	22,3	
Флакон №6, сусп. кл. селезенки /Vero E6, Ct 17,3 / Flask No6, susp. spleen cells/Vero E6, Ct 17.3	1/12 д. / days	2/7 д. / days	3/7 д. / days	4/7 д. / days	5/7 д. / days	6/7 д. / days	7/21 д. / days	8/14 д. / days	9/14 д. / days	10/14 д. / days, пересев reseeding	11/14 д. / days	12/28 д. / days	152
	20,0	22,87	21,7	20,9	17,9	18,5	21,8	16,43	16,6	15,7	19,5	22,8	
Флакон №7, сусп. макрофагов/Vero E6, Ct 23,4 / Flask No7, susp. macrophages/Vero E6, Ct 23.4	1/12 д. / days	2/7 д. / days	3/28 д. / days	-	-	-	-	-	-	-	-	-	47
	26,1	26,97	25,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Флакон №8, сусп. кл. легкого, хранение при -80°C/Vero E6, Ct 24,3 / Flask No8, lung cells susp./ storage at -80°C/Vero E6, Ct 24.3	1/7 д. / days	2/7 д. / days	3/7 д. / days	4/14 д. / days	-	-	-	-	-	-	-	-	35
	28,72	27,8	29,7	29,0	-	-	-	-	-	-	-	-	

новый монослой. Клетки Нер-2 в аналогичных условиях округляются, открепляются от поверхности пластика в виде единичных клеток и конгломератов, нарушая конфлюэнтность монослоя, в результате чего возникает необходимость пересева инфекционного материала на новый монослой.

Для определения жизнеспособности *C. burnetii* и их способности инфицировать клетки хозяина после хранения в условиях низкотемпературного холодильника материал от биопробных животных (белых мышей), содержащий *C. burnetii* (суспензия клеток легкого, Ct 24,3), был заморожен при температуре -80°C и хранился в течении 1 мес. Заражение культуры клеток этим материалом не привело к

увеличению количества специфической ДНК на протяжении 35 дней культивирования (табл. 3, флакон №8). В то же время при заражении белых мышей аналогичным материалом наблюдалось сохранение и увеличение количества ДНК в пределах Ct 19-25 на протяжении 28 дней (срок наблюдения, табл. 4).

В наших экспериментах поддерживали культуру *C. burnetii* в условиях *in vivo* и *in vitro* одновременно. Пассаж возбудителя через биопробное животное с последующим инфицированием культуры клеток способствовал поддержанию жизнеспособности коксии в течение более длительного времени. Наши наблюдения показали, что использование пери-

Таблица 4. Результаты культивирования *C. burnetii* в организме белых мышей после хранения суспензий органов при -80°C  
Table 4. Results of cultivation of *C. burnetii* in the body of white mice after storing organ suspensions at -80°C

Материал от биопробных животных/Ст в ПЦР Material from bioassay animals/Ct in PCR	Пассаж 1 (14 дней) / Passage 1 (14 days)		Пассаж 2 (14 дней) / Passage 2 (14 days)		Пассаж 3 (14 дней) / Passage 3 (14 days)	
	легкие / Lung	макрофаги / macrophages	легкие / Lung	макрофаги / macrophages	легкие / Lung	макрофаги / macrophages
Суспензия клеток легкого / Lung cell suspension Ct 24,3	24,8	25,6	25,4	21,3	20,1	24,9
Перитонеальные макрофаги / Peritoneal macrophages Ct 23,4	25,6	23,6	20,7	19,5	23,8	24,2

тонеальных макрофагов оптимально как для повторного заражения биопробных животных, так и для инокуляции в культуру клеток, поскольку суспензия макрофагов содержит минимальную примесь эритроцитов.

Для увеличения числа копий генома *C. burnetii* в культуре клеток применяли различные способы оптимизации условий роста: варьирование сроков культивирования возбудителя без смены ростовой среды (от 7 до 28 дней), содержание эмбриональной сыворотки в ростовой среде (оптимально 3%), использование различных клеточных линий (более эффективной моделью является культура клеток Vero E6).

Согласно полученным результатам, инфицирующая доза является решающим фактором, обеспечивающим длительное культивирование возбудителя *in vitro* в монослое эукариотических клеток. В данной работе максимальный срок культивирования материала от биопробных животных на клетках Vero E6 составил 152 дня (срок наблюдения), что позволило накопить специфическую ДНК коксиелл до значения Ct 15,7 в ПЦР. Сопоставимый показатель специфической ДНК возбудителя лихорадки Ку, равный Ct 12,5, был получен при использовании в качестве биологической модели беспородных белых мышей.

Результаты проведенного исследования показали также, что образцы сыворотки крови пациентов с острой лихорадкой Ку являются ценным источником жизнеспособной *C. burnetii*. Безусловно, медленный рост микроорганизма из образцов, содержащих малое количество бактерий, ограничивает применение модели культуры клеток в качестве диагностического инструмента, однако ее польза очевидна в случае подтверждения диагноза и создания коллекций изолятов *C. burnetii*. Кроме того, оценка основных свойств возбудителя возможна только при условии выделения жизнеспособных микроорганизмов.

#### 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 interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

#### Литература

- Marrie TJ, Raoult D. Q fever – a review and issues for the next century. Int J Antimicrob Agents. 1997;8(3):145-61. DOI: 10.1016/S0924-8579(96)00369-X
- Guatteo R, Seegers H, Taurel AF, Joly A, Beaudeau F. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: a critical review. Vet Microbiol. 2011 Apr 21;149(1-2):1-16. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.10.007
- In Q-fever. The Disease, Vol 1. Ed. Marrie TJ. Boca Raton: CRC Press; 1990.
- Lapointe JM, Gulland FM, Haines DM, Barr BC, Duignan PJ. Placentitis due to *Coxiella burnetii* in a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*). J Vet Diagn Invest. 1999 Nov;11(6):541-3. DOI: 10.1177/104063879901100612
- Kersh GJ, Lambourn DM, Self JS, Akmajian AM, Stanton JB, Baszler TV, et al. *Coxiella burnetii* infection of a Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*) found in Washington State. J Clin Microbiol. 2010 Sep;48(9):3428-31. DOI: 10.1128/JCM.00758-10
- Kersh GJ, Lambourn DM, Raverty SA, Fitzpatrick KA, Self JS, Akmajian AM, Jeffries SJ, Huggins J, Drew CP, Zaki SR, Massung RF. *Coxiella burnetii* infection of marine mammals in the Pacific Northwest, 1997–2010. J Wildl Dis. 2012 Jan;48(1):201-6. DOI: 10.7589/0090-3558-48.1.201
- Tissot-Dupont H, Amadei MA, Nezri M, Raoult D. Wind in November, Q fever in December. Emerg Infect Dis. 2004 Jul;10(7):1264-9. DOI: 10.3201/eid1007.030724
- Шпынов СН, Рудаков НВ, Зеликман СЮ. Анализ заболеваемости лихорадкой Ку в Российской Федерации в период с 1957 по 2019 год. Проблемы особо опасных инфекций. 2021;3:141-146. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-141-146
- Muskens J, van Engelen E, van Maanen C, Bartels C, Lam TJ. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in Dutch dairy herds based on testing bulk tank milk and individual samples by PCR and ELISA. Vet Rec. 2011 Jan 22;168(3):79. DOI: 10.1136/vr.c6106
- Arricau-Bouvery N, Souriau A, Lechopier P, Rodolakis A. Excretion of *Coxiella burnetii* during an experimental infection of pregnant goats with an abortive goat strain CbC1. Ann N Y Acad Sci. 2003 Jun;990:524-6. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07422.x
- Clark NJ, Soares Magalhães RJ. Airborne geographical dispersal of Q fever from livestock holdings to human communities: a systematic review and critical appraisal of evidence. BMC Infect Dis. 2018 May 15;18(1):218. DOI: 10.1186/s12879-018-3135-4
- Russell-Lodrigue KE, Andoh M, Poels MW, Shive HR, Weeks BR, Zhang GQ, et al. *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever. Infect Immun. 2009 Dec;77(12):5640-50. DOI: 10.1128/IAI.00851-09
- Kazar J. *Coxiella burnetii* infection. Ann N Y Acad Sci. 2005 Dec;1063:105-14. DOI: 10.1196/annals.1355.018
- Duron O, Noël V, McCoy KD, Bonazzi M, Sidi-Boumedine K, Morel O, et al. The Recent Evolution of a Maternally-Inherited Endosymbiont of Ticks Led to the Emergence of the Q Fever Pathogen, *Coxiella burnetii*. PLoS Pathog. 2015 May 15;11(5):e1004892. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004892
- Rahman Md S, Chakrabarty A, Sarker RR, Sharmy ST, Sarker AS, Parvin S, et al. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* in human, animals and ticks in Bangladesh. Afr J Microbiol Res. 2018;12(6):136-140. DOI: 10.5897/AJMR2017.8718

16. Рудаков НВ, Зеликман СЮ, Шпынов СН. Лихорадка Ку: эколого-эпидемиологические аспекты: информационное письмо. ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора. Омск: КАН, 2021.
17. Лобан КМ, Лобзин ЮВ, Лукин ЕП. Риккетсиозы человека: рук-во для врачей. М., СПб., ЭЛБИ-СПб, 2002;393-474.
18. Панферова ЮА, Токаревич НК, Блинова ОВ, Нафеев АА, Сиббаева ЭИ. Типирование некультивируемых изолятов *Coxiella burnetii* и *Coxiella*-подобных микроорганизмов, ассоциированных с клещами, с применением анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. Проблемы особо опасных инфекций. 2023;1:142-147. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-142-147
19. Рудаков НВ, Шпынов СН, Токаревич НК, Носков АК и др. Лабораторная диагностика лихорадки Ку: практическое руководство. ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций»; ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»; ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт». Омск: Издательский центр КАН, 2023.
20. Martinez E, Cantet F, Fava L, Norville I, Bonazzi M. Identification of OmpA, a *Coxiella burnetii* protein involved in host cell invasion, by multi-phenotypic high-content screening. PLoS Pathog. 2014 Mar 20;10(3):e1004013. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004013
21. Fenollar F, Fournier PE, Carrieri MP, Habib G, Messana T, Raoult D. Risks factors and prevention of Q fever endocarditis. Clin Infect Dis. 2001 Aug 1;33(3):312-6. DOI: 10.1086/321889
22. Landais C, Fenollar F, Thuny F, Raoult D. From acute Q fever to endocarditis: serological follow-up strategy. Clin Infect Dis. 2007 May 15;44(10):1337-40. DOI: 10.1086/515401
23. Чеканова ТА, Петремгвдлшвили К. Лихорадка КУ в Российской Федерации: взгляд на заболеваемость через призму уровня развития лабораторной диагностики. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2022;21(6):5-12. DOI: 10.31631/2073-3046-2022-21-6-5-12
24. Фрейлихман ОА, Токаревич НК, Кондрашова ВД. Лабораторные методы диагностики Ку-лихорадки и генотипирование *Coxiella burnetii*. Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2017;2:49-60.
25. Fournier PE, Raoult D. Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever. J Clin Microbiol. 2003 Nov;41(11):5094-8. DOI: 10.1128/JCM.41.11.5094-5098.2003
26. Schneeberger PM, Hermans MH, van Hannen EJ, Schellekens JJ, Leenders AC, Wever PC. Real-time PCR with serum samples is indispensable for early diagnosis of acute Q fever. Clin Vaccine Immunol. 2010 Feb;17(2):286-90. DOI: 10.1128/CVI.00454-09
27. Чеканова ТА, Шпынов СН, Неталиева СЖ, Бабаева МА. Диагностическая значимость определения спектра антител к *Coxiella burnetii* в I и II фазовых состояниях. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2018;23(4):165-171. DOI: 10.18821/1560-9529-2018-23-4-165-171
28. Boden K, Wolf K, Hermann B, Frangoulidis D. First isolation of *Coxiella burnetii* from clinical material by cell-free medium (ACCM2). Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015 May;34(5):1017-22. DOI: 10.1007/s10096-015-2321-1
29. Spyridaki I, Gikas A, Kofteridis D, Psaroulaki A, Tselentis Y. Q fever in the Greek island of Crete: detection, isolation, and molecular identification of eight strains of *Coxiella burnetii* from clinical samples. J Clin Microbiol. 1998 Jul;36(7):2063-7. DOI: 10.1128/JCM.36.7.2063-2067.1998
30. Gouriet F, Fenollar F, Patrice JY, Drancourt M, Raoult D. Use of shell-vial cell culture assay for isolation of bacteria from clinical specimens: 13 years of experience. J Clin Microbiol. 2005;43(10):4993-5002. DOI: 10.1128/JCM.43.10.4993-5002.2005
31. Lockhart MG, Islam A, Fenwick SG, Graves SR, Stenos J. Comparative sensitivity of four different cell lines for the isolation of *Coxiella burnetii*. FEMS Microbiol Lett. 2012;334(2):75-8. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02617.x
32. Панферова ЮА. Молекулярные основы патогенности *Coxiella burnetii*. Инфекция и иммунитет. 2016;6(1):7-24. DOI: 10.15789/2220-7619-2016-1-7-24
33. Sobotta K, Hillarius K, Mager M, Kerner K, Heydel C, Mange C. *Coxiella burnetii* infect primary bovine macrophages and limits their host cell response. Infect Immun. 2016; 84(6):1722-1734. DOI: 10.1128/IAI01208-15
34. Tujulin E, Lilliehöök B, Macellaro A, Sjöstedt A, Norlander L. Early cytokine induction in mouse P388D1 macrophages infected by *Coxiella burnetii*. Vet Immunol Immunopathol. 1999;68(2-4):159-68. DOI: 10.1016/s0165-2427(99)00023-9
35. Сокиркина ЕН, Тушинский АА, Савина ИВ, Леоненко НВ, Шитова НВ, Симакова ДИ, и др. Анализ заболеваемости лихорадкой Ку в Ростовской области за 2022–2023 гг. В сб.: Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за чумой и другими опасными инфекционными болезнями. Матер. научн.-практ. конф. Горно-Алтайск, 2023;65-66.
36. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета по охране животных, используемых в научных целях. СПб., 2012.
37. Brennan RE, Samuel JE. Evaluation of *Coxiella burnetii* antibiotic susceptibilities by real-time PCR assay. J Clin Microbiol. 2003; 41(5):1869-74. DOI: 10.1128/JCM.41.5.1869-1874.2003

## References

1. Marrie TJ, Raoult D. Q fever – a review and issues for the next century. Int J Antimicrob Agents. 1997;8(3):145-61. DOI: 10.1016/s0924-8579(96)00369-x
2. Guatteo R, Seegers H, Taurel AF, Joly A, Beaudeau F. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: a critical review. Vet Microbiol. 2011 Apr 21;149(1-2):1-16. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.10.007
3. In Q-fever. The Disease, Vol 1. Ed. Marrie TJ. Boca Raton: CRC Press; 1990.
4. Lapointe JM, Gulland FM, Haines DM, Barr BC, Duignan PJ. Placentitis due to *Coxiella burnetii* in a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*). J Vet Diagn Invest. 1999 Nov;11(6):541-3. DOI: 10.1177/104063879901100612
5. Kersh GJ, Lambourn DM, Self JS, Akmajian AM, Stanton JB, Baszler TV, et al. *Coxiella burnetii* infection of a Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*) found in Washington State. J Clin Microbiol. 2010 Sep;48(9):3428-31. DOI: 10.1128/JCM.00758-10
6. Kersh GJ, Lambourn DM, Raverty SA, Fitzpatrick KA, Self JS, Akmajian AM, Jeffries SJ, Huggins J, Drew CP, Zaki SR, Massung RF. *Coxiella burnetii* infection of marine mammals in the Pacific Northwest, 1997–2010. J Wildl Dis. 2012 Jan;48(1):201-6. DOI: 10.7589/0090-3558-48.1.201
7. Tissot-Dupont H, Amadei MA, Nezri M, Raoult D. Wind in November, Q fever in December. Emerg Infect Dis. 2004 Jul;10(7):1264-9. DOI: 10.3201/eid1007.030724
8. Shpynov SN, Rudakov NV, Zelikman SYu. Analysis of Q Fever Incidence in the Russian Federation Between 1957 and 2019. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2021;3:141-146. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-141-146 (In Russian).
9. Muskens J, van Engelen E, van Maanen C, Bartels C, Lam TJ. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in Dutch dairy herds based on testing bulk tank milk and individual samples by PCR and ELISA. Vet Rec. 2011 Jan 22;168(3):79. DOI: 10.1136/vr.c6106
10. Arricau-Bouvery N, Souriau A, Lechopier P, Rodolakis A. Excretion of *Coxiella burnetii* during an experimental infection of pregnant goats with an abortive goat strain CbC1. Ann N Y Acad Sci. 2003 Jun;990:524-6. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07422.x
11. Clark NJ, Soares Magalhães RJ. Airborne geographical dispersal of Q fever from livestock holdings to human communities: a systematic review and critical appraisal of evidence. BMC Infect Dis. 2018 May 15;18(1):218. DOI: 10.1186/s12879-018-3135-4
12. Russell-Lodrigue KE, Andoh M, Poels MW, Shive HR, Weeks BR, Zhang GQ, et al. *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever. Infect Immun. 2009 Dec;77(12):5640-50. DOI: 10.1128/IAI.00851-09

13. Kazar J. *Coxiella burnetii* infection. Ann N Y Acad Sci. 2005 Dec;1063:105-14. DOI: 10.1196/annals.1355.018
14. Duron O, Noël V, McCoy KD, Bonazzi M, Sidi-Boumedine K, Morel O, et al. The Recent Evolution of a Maternally-Inherited Endosymbiont of Ticks Led to the Emergence of the Q Fever Pathogen, *Coxiella burnetii*. PLoS Pathog. 2015 May 15;11(5):e1004892. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004892
15. Rahman Md S, Chakrabarty A, Sarker RR, Sharmy ST, Sarker AS, Parvin S, et al. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* in human, animals and ticks in Bangladesh. Afr J Microbiol Res. 2018;12(6):136-140. DOI: 10.5897/AJMR2017.8718
16. Rudakov NV, Zelikman SYu, Shpynov SN. Lihoradka Ku: ekologo-epidemiologicheskie aspekty: informacionnoe pis'mo. FBUN «Omskij NII prirodno-ochagovykh infektsii» Rospotrebnadzora. Omsk: KAN, 2021. (In Russian).
17. Loban KM, Lobzin YuV, Lukin EP. Rikketsiozy cheloveka: ruk-vo dlya vrachej. M., SPb., ELBI-SPb, 2002;393-474. (In Russian).
18. Panferova YuA, Tokarevich NK, Blinova OV, Nafeev AA, Sibaeva EI. Typing of Uncultured Isolates of *Coxiella burnetii* and *Coxiella*-Like Microorganisms Associated with Ticks Using 16S rRNA Gene Nucleotide Sequence Analysis. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2023;1:142-147. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-142-147 (In Russian).
19. Rudakov NV, Shpynov SN, Tokarevich NK, Noskov AK, et al. Laboratornaya diagnostika likhoradki Ku: prakticheskoe rukovodstvo. FBUN «Omskij NII prirodno-ochagovykh infektsii»; FBUN «Sankt-Peterburgskij NII epidemiologii i mikrobiologii im. Pastera»; FKUZ «Rostovskii-na-Donu nauchno-issledovatel'skii protivochumnyi institut». Omsk: Izdatel'skii tsentr KAN, 2023. (In Russian).
20. Martinez E, Cantet F, Fava L, Norville I, Bonazzi M. Identification of OmpA, a *Coxiella burnetii* protein involved in host cell invasion, by multi-phenotypic high-content screening. PLoS Pathog. 2014 Mar 20;10(3):e1004013. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004013
21. Fenollar F, Fournier PE, Carrieri MP, Habib G, Messana T, Raoult D. Risks factors and prevention of Q fever endocarditis. Clin Infect Dis. 2001 Aug 1;33(3):312-6. DOI: 10.1086/321889
22. Landais C, Fenollar F, Thuny F, Raoult D. From acute Q fever to endocarditis: serological follow-up strategy. Clin Infect Dis. 2007 May 15;44(10):1337-40. DOI: 10.1086/515401
23. Chekanova TA, Petremgvdishvili K. Q Fever in the Russian Federation: a View on Incidence through the Level of Development of Laboratory Diagnosis. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2022;21(6):5-12. DOI: 10.31631/2073-3046-2022-21-6-5-12 (In Russian).
24. Freylikhman OA, Tokarevich NK, Kondrashova VD. Methods of laboratory diagnosis of Q fever and genotyping of *Coxiella burnetii*. Infectious Diseases. News, Opinions, Training. 2017;2:49-60. (In Russian).
25. Fournier PE, Raoult D. Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever. J Clin Microbiol. 2003 Nov;41(11):5094-8. DOI: 10.1128/JCM.41.11.5094-5098.2003
26. Schneeberger PM, Hermans MH, van Hannen EJ, Schellekens JJ, Leenders AC, Wever PC. Real-time PCR with serum samples is indispensable for early diagnosis of acute Q fever. Clin Vaccine Immunol. 2010 Feb;17(2):286-90. DOI: 10.1128/CVI.00454-09
27. Chekanova TA, Shpynov SN, Netalieva SZh, Babaeva MA. Diagnostic significance of antibodies spectrum to *Coxiella burnetii* in I and II phases. Epidemiology and Infectious Diseases (Epidemiologiya i infektsionnye bolezni). 2018;23(4):165-171. DOI: 10.18821/1560-9529-2018-23-4-165-171 (In Russian).
28. Boden K, Wolf K, Hermann B, Frangoulidis D. First isolation of *Coxiella burnetii* from clinical material by cell-free medium (ACCM2). Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015 May;34(5):1017-22. DOI: 10.1007/s10096-015-2321-1
29. Spyridaki I, Gikas A, Kofteridis D, Psaroulaki A, Tselentis Y. Q fever in the Greek island of Crete: detection, isolation, and molecular identification of eight strains of *Coxiella burnetii* from clinical samples. J Clin Microbiol. 1998 Jul;36(7):2063-7. DOI: 10.1128/JCM.36.7.2063-2067.1998
30. Gouriet F, Fenollar F, Patrice JY, Drancourt M, Raoult D. Use of shell-vial cell culture assay for isolation of bacteria from clinical specimens: 13 years of experience. J Clin Microbiol. 2005;43(10):4993-5002. DOI: 10.1128/JCM.43.10.4993-5002.2005
31. Lockhart MG, Islam A, Fenwick SG, Graves SR, Stenos J. Comparative sensitivity of four different cell lines for the isolation of *Coxiella burnetii*. FEMS Microbiol Lett. 2012;334(2):75-8. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02617.x
32. Panferova YuA. *Coxiella burnetii* pathogenicity molecular basis. Russian Journal of Infection and Immunity. 2016;6(1):7-24. DOI: 10.15789/2220-7619-2016-1-7-24 (In Russian).
33. Sobotta K, Hillarius K, Mager M, Kerner K, Heydel C, Mange C. *Coxiella burnetii* infect primary bovine macrophages and limits their host cell response. Infect Immun. 2016; 84(6):1722-1734. DOI: 10.1128/IAI01208-15
34. Tujulin E, Lilliehöök B, Macellaro A, Sjöstedt A, Norlander L. Early cytokine induction in mouse P388D1 macrophages infected by *Coxiella burnetii*. Vet Immunol Immunopathol. 1999;68(2-4):159-68. DOI: 10.1016/s0165-2427(99)00023-9
35. Sokirkina EN, Tushinskii AA, Savina IV, Leonenko NV, Shitova NV, Simakova DI, i dr. Analiz zabolevaemosti likhoradkoi Ku v Rostovskoi oblasti za 2022–2023 gg. V sb.: Aktual'nye voprosy epidemiologicheskogo nadzora za chumoi i drugimi opasnymi infektsionnymi boleznyami. Mater. nauchn.-prakt. konf. Gorno-Altaysk, 2023;65-66. (In Russian).
36. Direktiva 2010/63/EU Evropeiskogo parlamenta i soveta po okhrane zhivotnykh, ispol'zuemykh v nauchnykh tselyakh. St. Petersburg, 2012. (In Russian).
37. Brennan RE, Samuel JE. Evaluation of *Coxiella burnetii* antibiotic susceptibilities by real-time PCR assay. J Clin Microbiol. 2003; 41(5):1869-74. DOI: 10.1128/JCM.41.5.1869-1874.2003

#### Информация о соавторах:

Симакова Диана Игоревна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, исполняющая обязанности заведующего лабораторией диагностических препаратов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Алексеева Людмила Павловна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории диагностических препаратов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Левченко Дарья Александровна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, исполняющая обязанности заведующего лабораторией экспериментально-биологических моделей и биологической безопасности ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Мелоян Мисак Геворгович, младший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Сокиркина Елена Николаевна, младший научный сотрудник отдела эпидемиологии ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

#### Information about co-authors:

Diana I. Simakova, PhD in Biological Sciences, Head of the Laboratory of diagnostic preparations, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor

Ludmila P. Alekseeva, PhD, DSc (Biological Sciences), Professor, Senior Researcher, Laboratory of diagnostic preparations, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor

Daria A. Levchenko, PhD, MD, Senior Researcher, Head of the Laboratory of Experimental Biological Models and Biological Safety, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor

Misak G. Meloyan, Junior Researcher, Laboratory of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor

Elena N. Sokirkina, Junior Researcher, Department of Epidemiology, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor



# IS-генотипирование штаммов *Yersinia pestis* с помощью полимеразной цепной реакции

А.Л.Трухачев<sup>1</sup>, М.Г.Мелоян<sup>1</sup>, А.С.Водопьянов<sup>1</sup>, О.Н.Подладчикова<sup>1</sup>, А.А.Ковалевич<sup>1</sup>, С.Ю.Темякова<sup>1</sup>, Р.В.Писанов<sup>1</sup>, Д.А.Кузнецова<sup>1</sup>, В.А.Рыкова<sup>1</sup>, Г.Х.Базарова<sup>2</sup>, А.Ю.Югушев<sup>2</sup>, Е.Н.Рождественский<sup>2</sup>, А.К.Носков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов на Дону, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора, Горно-Алтайск, Республика Алтай, Российская Федерация

Проведен анализ расположения четырех IS-элементов (IS100, IS285, IS1541, IS1661) в геномах штаммов *Yersinia pestis* различных подвигов и биоваров. Результаты анализа расположения IS-элементов позволили определить IS-маркеры в этих штаммах и сконструировать праймеры для их выявления с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Тестирование сконструированных праймеров было проведено на 109 штаммах *Y. pestis*. Результаты тестирования показали, что набор из 22 пар праймеров позволяет различать подвиды и биовары штаммов возбудителя чумы, а также отдельные генетические группы внутри биоваров. В результате такого подхода предложен простой и доступный способ внутривидовой генетической дифференциации чумного микроба – IS-генотипирование, основанное на ПЦР-детекции мест внедрения IS-элементов в геномах разных штаммов возбудителя чумы. Этот способ не требует больших материальных затрат и использования высокотехнологичного оборудования.

**Ключевые слова:** *Yersinia pestis*, IS-генотипирование, генотипирование, полимеразная цепная реакция

**Для цитирования:** Трухачев А.Л., Мелоян М.Г., Водопьянов А.С., Подладчикова О.Н., Ковалевич А.А., Темякова С.Ю., Писанов Р.В., Кузнецова Д.А., Рыкова В.А., Базарова Г.Х., Югушев А.Ю., Рождественский Е.Н., Носков А.К. IS-генотипирование штаммов *Yersinia pestis* с помощью полимеразной цепной реакции. Бактериология. 2024; 9(1): 72–80. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-72-80

## IS-genotyping of *Yersinia pestis* strains using PCR

A.L.Trukhachev<sup>1</sup>, M.G.Meloyan<sup>1</sup>, A.S.Vodopyanov<sup>1</sup>, O.N.Podladchikova<sup>1</sup>, A.A.Kovalevich<sup>1</sup>, S.Yu.Temyakova<sup>1</sup>, R.V.Pisanov<sup>1</sup>, D.A.Kuznetsova<sup>1</sup>, V.A.Rykova<sup>1</sup>, G.Kh.Bazarova<sup>2</sup>, A.Yu.Yugushev<sup>2</sup>, E.N.Rozhdestvensky<sup>2</sup>, A.K.Noskov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation;

<sup>2</sup>Altai Anti-Plague Station of Rospotrebnadzor, Gorno-Altai, Altai Republic, Russian Federation

The article analyzed location of four IS elements (IS100, IS285, IS1541, IS1661) in the genomes of *Yersinia pestis* strains of various subspecies and biovars. The results of the analysis of the location of IS-elements made it possible to identify IS markers in these strains and design primers for their detection by PCR. Testing of the designed primers was carried out using 109 *Y. pestis* strains. The results showed that the set of 22 pairs of primers made it possible to distinguish between subspecies and biovars of the plague causative agent strains, as well as individual genetic groups within biovars. This approach resulted in the development of a simple and convenient method of intraspecies genetic differentiation of the plague microbe – IS-genotyping, based on PCR detection of IS-elements insertion sites in the genomes of different plague pathogen strains. This method does not require large material costs or high-tech equipment.

**Key words:** *Yersinia pestis*, IS-genotyping, genotyping, PCR

**For citation:** Trukhachev A.L., Meloyan M.G., Vodopyanov A.S., Podladchikova O.N., Kovalevich A.A., Temyakova S.Yu., Pisanov R.V., Kuznetsova D.A., Rykova V.A., Bazarova G.Kh., Yugushev A.Yu., Rozhdestvensky E.N., Noskov A.K. IS-genotyping of *Yersinia pestis* strains using PCR. Bacteriology. 2024; 9(1): 72–80. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-72-80

### Для корреспонденции:

Трухачев Алексей Леонидович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117

Телефон: (863) 240-2703

E-mail: trukhachev\_al@antiplague.ru

Статья поступила 06.10.2023, принята к печати 29.03.2024

### For correspondence:

Aleksey L. Trukhachev, MD, PhD, Leading Researcher of the Laboratory of Molecular Biology of Natural Focal and Zoonotic Infections of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

Address: 117/40 M.Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, 117/40 Russian Federation

Телефон: (863) 240-2703

E-mail: trukhachev\_al@antiplague.ru

The article was received 06.10.2023, accepted for publication 29.03.2024

**В**озбудитель чумы (*Yersinia pestis*) является наиболее опасным для человека представителем рода *Yersinia*, поэтому изучение и совершенствование методов его идентификации остается в настоящее время актуальной задачей. При характеристике штаммов этого микроорганизма особое внимание уделяют их генетической дифференциации, которую проводят для более точного определения их таксономического положения, выяснения филогенетических связей, а также получения информации для эпидемиологического анализа. Многочисленные методы генотипирования позволяют относить исследуемые штаммы к какой-либо генетической группе. Наиболее эффективные методы генотипирования основаны на данных секвенирования, что не всегда может быть выполнено оперативно при анализе вновь выделенных штаммов.

Среди разработанных способов генотипирования штаммов *Y. pestis* с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) известны и часто применяются такие методы, как анализ инсерционных и делеционных мутаций (INDEL) [1–3] и выявление переменных тандемных повторов (MLVA) [4, 5]. На основе INDEL разработаны наборы реагентов, позволяющие проводить идентификацию подвидов и биоваров чумного микроба [6–8]. Более детальные различия штаммов удается выявить с помощью MLVA, который применяется при анализе близкородственных штаммов или штаммов, выделенных в одном очаге [9–11].

Возможность использования мобильных генетических элементов для внутривидовой дифференциации *Y. pestis* была продемонстрирована разными авторами. Первые работы [12, 13] в этом направлении были основаны на выявлении IS-элементов в рестрикционных фрагментах хромосомной ДНК штаммов с помощью ДНК-гибридизации. Применимость этого метода геномной дактилоскопии для внутривидовой генетической дифференциации штаммов *Y. pestis* была подтверждена при анализе большого числа штаммов *Y. pestis* [14, 15]. При этом эффективность дифференциации возрастала с увеличением количества IS-элементов, используемых в качестве зондов. Метод генетической дактилоскопии не нашел широкого применения в практике генетического анализа штаммов возбудителя чумы из-за его сложности и недостаточной воспроизводимости.

Использование ПЦР для выявления точной локализации IS100 в геноме *Y. pestis* и генотипирования различных штаммов *Y. pestis* позволило провести дифференциацию возбудителей чумы и псевдотуберкулеза, а также выявить ряд генетических различий у биоваров *Y. pestis* [16]. Подобный метод IS-генотипирования был применен для выявления филогенетических связей различных штаммов *Y. pestis* [17]. О потенциальной возможности увеличения дискриминирующей способности метода IS-типирования свидетельствуют данные анализа нуклеотидных последовательностей секвенированных штаммов *Y. pestis*. Установлено, что *Y. pestis* содержит как минимум четыре уникальных IS-элемента [18], которые различаются по локализации в геномах разных штаммов. Понимание того, что перестройки генома, индуцированные мобильными генетическими элементами, в большинстве случаев закрепляются и элементы остаются в месте инсерции, дает возможность использовать их нуклеотидные последовательности в качестве генетических IS-

маркеров отдельных групп штаммов. Целью настоящего исследования стало выявление новых IS-маркеров, характерных для разных групп штаммов *Y. pestis*, и оценка возможности их использования для внутривидовой дифференциации возбудителей чумы.

## Материалы и методы

### Штаммы, использованные в работе

Тестирование разработанных праймеров в ПЦР *in vitro* проводили на 19 штаммах *Y. pestis* различных подвидов и биоваров (в данной работе использована внутривидовая классификация чумного микроба, предложенная в [1]). Из штаммов основного подвида (*Y. pestis* ssp. *pestis*) использовали 6 штаммов *Y. pestis* bv. *Antiqua* (по два из Киргизии, Конго и Алтая); 2 штамма bv. *Mediaevalis* (из Китая) и 2 штамма bv. *Orientalis* (из Мадагаскара и Вьетнама). Штаммы неосновных подвидов были представлены 3 штаммами ssp. *caucasica* (из Азербайджана, Армении, Дагестана), 1 штаммом ssp. *ulegeica* (из Монголии). Биовары центрально-азиатского подвида включали 2 штамма bv. *talassica* (из Киргизии) и по 1 штамму bv. *altaica* (из Алтая), bv. *hissarica* (из Таджикистана), bv. *microtus* (из Китая). Штаммы получены из коллекции живых культур Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора. Используемые в работе штаммы культивировали на плотной и жидкой среде LB и среде Хоттингера (pH 7,2) и проверяли на соответствие паспортным данным по различным дифференциально-диагностическим тестам [19], а также с помощью набора реагентов для внутривидовой дифференциации *Y. pestis* («Синтол», Москва) позволяющего различать штаммы основного и неосновных подвидов.

### Методы биоинформационного анализа

Анализ нуклеотидных последовательностей штаммов *Y. pestis* из базы данных NCBI и секвенированных в настоящем исследовании проводили с помощью таких веб-ресурсов, как KEGG (<https://www.kegg.jp>) и BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), а также авторских компьютерных программ, созданных ранее: ContigSearcher [20] и YersiniaPestisAnalyzer [21]. Программа ContigSearcher позволяет в результатах полного или незавершенного (в виде контигов) секвенирования геномной ДНК определять наличие любого гена или нуклеотидной последовательности. Программа YersiniaPestisAnalyzer проводит сравнение геномов *Y. pestis* и заложенных в память программы нуклеотидных последовательностей, характерных для разных групп штаммов возбудителя чумы.

Конструирование олигонуклеотидных праймеров для выявления IS-маркеров проводили на основе анализа полногеномных нуклеотидных последовательностей разных штаммов с помощью специализированных компьютерных программ Vector NTI9 (Invitrogen) и BLAST. Нуклеотидные последовательности сконструированных праймеров были внесены в базу данных программы YersiniaPestisAnalyzer. Синтез праймеров осуществлен в ЗАО «Евроген» (Москва). Анализ генетических связей и построение дендрограммы проводили при использовании результатов анализа IS-маркеров у разных штаммов с помощью программы SRplot и алгоритма UPGMA (<https://www.bioinformatics.com.cn>).

Подготовка и проведение ПЦР-анализа исследуемых штаммов.

Тестирование разработанных праймеров проводили в ПЦР *in silico* и *in vitro*. Для ПЦР *in silico* из базы данных NCBI были отобраны 90 штаммов *Y. pestis* различных биоваров и подвидов, выделенных в различных очагах чумы в разных странах мира. Для проведения ПЦР *in vitro* использовали 19 штаммов, из которых выделяли ДНК с помощью набора реагентов «Проба НК» («ДНК-технология», Москва) согласно инструкции по применению набора. Условия проведения ПЦР были определены в соответствии со структурой праймеров и величиной ампликона. Продукты амплификации анализировали в 2%-м агарозном геле или 8%-м полиакриламидном геле.

## Результаты исследования и обсуждение

### Выявление IS-маркеров в различных штаммах *Y. pestis*

На первом этапе работы с помощью интернет-ресурса KEGG в геноме *Y. pestis* CO92 был проведен поиск локусов, содержащих такие инсерционные элементы, как IS100, IS285, IS1541, IS1661. Затем в программе BLAST проводили поиск выявленных локусов у разных штаммов *Y. pestis* из базы данных NCBI, который выявил разнообразие распределения IS-элементов в геномах разных штаммов. В ходе этого исследования обнаружено 70 локусов, которые у отдельных групп штаммов различались по наличию или отсутствию анализируемых IS-элементов. Представителями этих групп стали 9 штаммов *Y. pestis* разных подвидов и биоваров: CO92, Antiqua, Nepal516, Harbin35, Nicholisk41, Microtus 91001, Pestoides F, Pestoides B, Angola. В результате сравнительного анализа этих штаммов *Y. pestis* отобрано 22 локуса, которые использовали в качестве IS-маркеров отдельных групп штаммов. Для выявления каждого из обнаруженных IS-маркеров сконструированы 22 пары праймеров. 14 пар содержали праймеры, один из которых комплементарен последовательности локуса, а другой – последовательности IS-элемента. Для тех групп штаммов, у которых IS-элемент в анализируемом локусе отсутствовал, сконструированы пары праймеров, комплементарных интактному локусу (8 пар). Структура всех использованных в работе 22 пар праймеров и их локализация в геномах разных штаммов *Y. pestis* приведены в табл. 1.

Способность сконструированных праймеров дифференцировать различные группы штаммов *Y. pestis*, относящихся к разным подвидам и биоварам, была подтверждена с помощью ПЦР *in silico* и *in vitro*. ПЦР *in silico* проводили с помощью программ BLAST и ContigSearcher, используя нуклеотидные последовательности 90 штаммов *Y. pestis*, полные геномы которых содержатся в базе данных NCBI. В ПЦР *in vitro* анализировали 19 штаммов *Y. pestis*, имеющихся в нашем распоряжении. Результаты тестирования 22 пар праймеров показали, что они позволяют различать штаммы *Y. pestis* разных подвидов и биоваров, а также дают возможность выделить отдельные генетические группы внутри биоваров основного подвида (*ssp. pestis*). При этом принадлежность штаммов к конкретным генетическим группам, выявленная в ПЦР *in silico* и *in vitro*, совпадала.

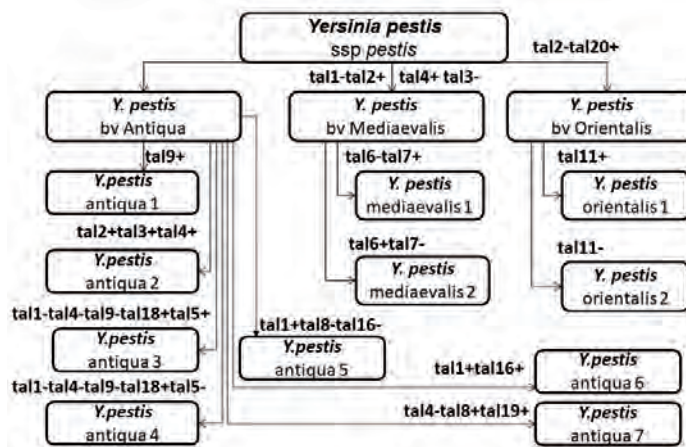


Рис. 1. Генотипы штаммов *Y. pestis* основного подвида, выявленные с помощью IS-маркеров.

Fig. 1. Genotypes of *Y. pestis* strains of the main subspecies, identified using IS markers.

**IS-генотипирование штаммов *Y. pestis* основного подвида (*Y. pestis ssp. pestis*).** Для генотипирования в ПЦР *in silico* были использованы геномы штаммов основного подвида из базы данных NCBI, которые ранее использовались другими авторами для SNP-анализа [1, 17, 22–24]. Данные этих авторов позволяли сравнить результаты IS- и SNP-генотипирования. Все исследуемые штаммы основного подвида на основании результатов ПЦР с помощью сконструированных праймеров отнесены к 11 генетическим группам (рис. 1).

Как видно на рис. 1, штаммы *Y. pestis* основного подвида биовара Antiqua, в зависимости от результатов ПЦР с различными праймерами, разделяются на 7 групп. Первая группа, названная antiqua 1, дифференцировалась от всех других штаммов с помощью праймеров tal9 и включала африканские штаммы bv. Antiqua, которые в литературе по результатам SNP-анализа отнесены к генотипу 1.ANT [17, 22]. В группу antiqua 2 входили штаммы генотипа 2.ANT [17, 22], которые положительно реагировали с праймерами tal2, tal3 и tal4. Группа штаммов antiqua 3 отличалась от других штаммов отсутствием реакции с праймерами tal1, tal4, tal9, положительной реакции с tal5, tal18 и включала штаммы, которые были отнесены к генотипу 3.ANT [1, 23]. Группа antiqua 4 содержала штаммы, отнесенные к генотипам 4.ANT [1, 23], которые отличались от предыдущей группы отрицательной реакцией с праймерами tal5. Штаммы группы antiqua 5 реагировали с праймерами tal1 и не реагировали с праймерами tal8 и tal16. Надо отметить, что в ходе дальнейших исследований было обнаружено, что штаммы этой группы возможно разделить на 2 типа: штаммы первого типа положительно реагировали с tal22, в то время как штаммы второго типа с этими праймерами не реагировали. Шестая группа, antiqua 6, содержала штаммы, дающие положительную реакцию с праймерами tal1 и tal16 и относящиеся к генотипу 0.ANT2 [1]. Группа antiqua 7, включающая штаммы генотипа 0.ANT3 [1], положительно реагировала с праймерами tal8 и tal19 и отрицательно – с праймерами tal4.

Все штаммы bv. Mediaevalis можно отличить от штаммов других биоваров и подвидов с помощью 4 пар праймеров, которые давали положительную реакцию с tal2, tal4 и отри-

Таблица 1. Структура, локализация в геноме *Y. pestis* и длина ампликона с праймерами, выявляющими IS-маркеры  
 Table 1. Structure, localization in the *Y. pestis* genome and length of the amplicon with primers that detect IS markers

N	Нуклеотидная последовательность праймеров / Nucleotide sequence of primers	Генетические локусы, содержащие IS-маркеры / Genetic loci containing IS markers	Ампликон, п.н. / Amplicon, bp
tal1	ATGCTGTTTAATTTCCGCTC TCATCCTTTTGGTATCCCAT	YPDSF_1927 в штамме Pestoides F / in the Pestoides F strain	152
tal2	GTGTTTGGGGAGTGGTCATA GCATCATTTCCAGCAAGGTA	CH583335 в штамме Antiqua / in the Antiqua strain	337
tal3	AACCCAATTCCTCAGCACAA TCAGACAGAAACGAAAGGCC	YPN_3942 в штамме Nepal516 / in the Nepal516 strain транспозаза IS100 / transposase IS100	205
tal4	GGTACGCCAAGCGATATCTTTATC AGGTTGTTTATTGGCGATCAAGG	YPO2570 в штамме CO92 / in the CO92 strain транспозаза IS285 / transposase IS285	269
tal5	ATGAAAATTACAGTGGTCTGTGG TAATGCTGCAGATAAGCGCT	YPA_2059 в штамме Antiqua / in the Antiqua strain	267
tal6	GGGAAATCGGTCAACAGCCT GTGAGCAACTCTCGATCCCGT	YPO2034 в штамме CO92 / in the CO92 strain транспозаза IS1541 / transposase IS1541	278
tal7	TTCCAGTCTACGCCTTGTT TCAAACAGGATCACGTCTGG	CH55_705 в штамме Harbin35 / in the Harbin35 strain	233
tal8	GTGAGCAACTCTCGATCCCGT GCTTTGCGAATGACTTTGTGAGA	YPO 0205 в штамме CO92 / in the CO92 strain транспозаза IS1541 / transposase IS1541	290
tal9	GCTTTGCGAATGACTTTGTGAGA GCTACTCATTCCCTGCTTGTC	Участок перед геном YPA 3265 в штамме Antiqua / The region in front of the YPA 3265 gene in the Antiqua strain транспозаза IS100 / transposase	334
tal 10	AGCAAGAAAGCTATCGTGCG ACTCATTCCCTGCTTGTC	YPDSF_3590 в штамме Pestoides F / in the Pestoides F strain транспозаза IS100 / transposase	408
tal 11	TCTCCCTGAATCGGTTCCAGTAC AAGCTAATCCTGAGTAAACGGTGG	YPO 0171 в штамме CO92 / in the CO92strain транспозаза IS100 / transposase	145
tal 12	GTCCGTAATCGCGAACAGTT AGCTTTCCAGCTTTGGGTCAG	CH56_3338 в штамме Angola / in the Angola strain CH56_3339 в штамме Angola / in the Angola strain	361
tal 13	GCACGGTTGATCGTCATACG TCTGATTTCCAGGCGTTGGGT	YP1823 в штамме Microtus 91001 / in the Microtus 91001 strain транспозаза IS100 / transposase	305
tal 14	ATATTGGGCGGTTGGTGGAG CTGAGCGAAGTGGTGCCTAT	YP_2529 в штамме Microtus 91001 / in the Microtus 91001 strain YP_2531 в штамме Microtus 91001 / in the Microtus 91001 strain	254
tal 15	GCCCAGATAAAAGCGCAATTT AAGCTAATCCTGAGTAAACGGTGG	CH63_1977 в штамме Nicholisk41 / in the Nicholisk41 strain транспозаза IS100 / transposase IS100	206
tal 16	TTGAACCGAACCTCCAGATC GCTCATCCCAGTCACTTAGTTCT	YPO0995 в штамме CO92 / in the CO92 strain транспозаза IS1661 / transposase IS1661	278
tal 17	TGATCGTAGTCACAATTGTGAC AAGCACTGTTACCCGGAATG	YPA1757 в штамме Antiqua / in the Antiqua strain	292
tal 18	TCTTTGAAGCCGTATCCATC ATCGTCGATAAAATGGAATACC	YPO2106 в штамме CO92 / in the CO92 strain транспозаза IS285 / transposase IS285	275
tal 19	TGACGAGGTGTAGCCGTGGT GCTACTCATTCCCTGCTTGTC	YPO3541 в штамме CO92 / in the CO92 strain транспозаза IS100 / transposase IS100	185
tal 20	ACATTGACTAAAATAACTACCCGAC GCTACTCATTCCCTGCTTGTC	YPO1014(ppdC) в штамме CO92 / in the CO92strain транспозаза IS100 / transposase IS100	273
tal 21	CAGCATCTTGGCAATAATCAAAGAA AGGTTGTTTATTGGCGATCAAGG	YPO 2104 в штамме CO92 in the CO92 strain транспозаза IS285 / transposase IS285	202
tal 22	GTAGCCGTGGTAGAAGAAAAT TGAGCAGCAAGAAAGCTATC	CH60_204 в штамме Pestoides B / in the Pestoides B strain CH60_204 в штамме Pestoides B / in the Pestoides B strain	338

цательную – с tal1, tal3. С помощью любой из трех пар праймеров (tal6, tal7 и tal15) возможна дифференциация штаммов *Y. pestis* bv. Mediaevalis на две генетические подгруппы. Штаммы, положительно реагирующие с tal7, tal15 и отрицательно – с tal6, составляют группу mediaevalis 1, а штаммы, положительно реагирующие с tal6 и отрицательно – с tal7, tal15, составляют группу mediaevalis 2. Представителями группы mediaevalis 1 были такие штаммы, как Nicholisk 41 и Harbin 35, а mediaevalis 2 – все остальные штаммы этого биовара.

Штаммы *Y. pestis* bv. Orientalis дифференцировались от штаммов других биоваров основного подвида с помощью праймеров tal20, с которыми реагировали положительно, и праймеров tal2, с которыми давали отрицательный результат. Праймеры tal11 позволяли разделять штаммы *Y. pestis* bv. Orientalis на две группы: orientalis 1 (tal11+) и orientalis 2 (tal11-). В первую группу попали штаммы *Y. pestis* CO92, INS, Cadman (SNP-группа 1.ORI1), а во вторую - все другие штаммы *Y. pestis* bv. Orientalis, имеющиеся в базе данных NCBI (1.ORI1, 2, 3).

Исследование показало, что с помощью предложенных праймеров можно определять не только биовары исследуемых штаммов *Y. pestis* основного подвида, но и их принадлежность к отдельной генетической группе биовара.

Генотипирование штаммов *Y. pestis* неосновных подвидов. Штаммы неосновных подвидов выявляются при одно-

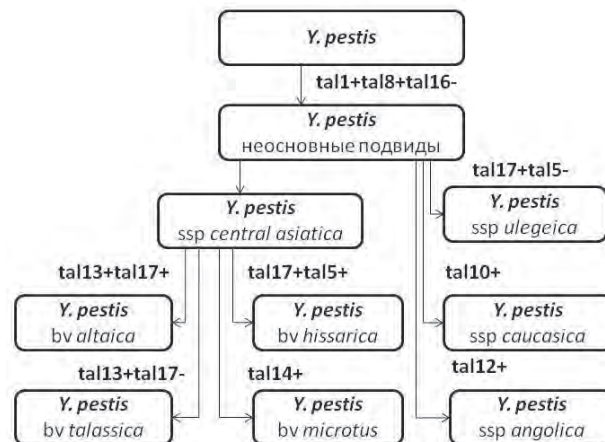


Рис. 2. Выявление генетических групп, соответствующих разным неосновным подвидам и биоварам *Y. pestis*. Классификация подвидов и биоваров *Y. pestis* в соответствии с решением Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации в 2019 г. [1].

Fig. 2. Identification of genetic groups corresponding to different minor subspecies and biovars of *Y. pestis*. Classification of subspecies and biovars of *Y. pestis* in accordance with the decision of the coordinating scientific council for sanitary and epidemiological protection of the territory of the Russian Federation in 2019 [1].

Таблица 2. Результаты ПЦР с праймерами, выявляющими IS-маркеры в штаммах *Y. pestis*  
 Table 2. PCR results with primers identifying IS markers in *Y. pestis* strains

Штамм / Strain	IS-генотип / IS genotype	Праймеры / Primers																	
		tal 1	tal 2	tal 3	tal 4	tal 5	tal 6	tal 7	tal 8	tal 9	tal 11	tal 15	tal 16	tal 18	tal 19	tal 20	tal 21	tal 22	
Antiqua	antiqua 1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	
FDAARGOS601	antiqua 1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	
Nairobi	antiqua1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	
MGJZ3	antiqua3	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
MGJZ7	antiqua3	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
MGJZ12	antiqua4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
I-3223	antiqua4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
CMCC8211	antiqua5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
945	antiqua5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
A-1691	antiqua5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
A-1836	antiqua5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
Nepal 516	antiqua2	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	
Harbin35	mediaevalis1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	
Nicholisk 41	mediaevalis1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	
KIM10+	mediaevalis2	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	
FDAARGOS603	mediaevalis2	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	
CO92	orientalis1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	
EV_NIIEG	orientalis2	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	
Angola	ssp. angolica	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	
Pestoides B	bv. altaica	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
Pestoides F	ssp. caucasica	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
Microtus 91001	ssp. microtus	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
20947	antiqua8	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
20948	antiqua8	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	

0 – отрицательный результат, 1 – положительный результат. / 0 – negative result, 1 – positive result.

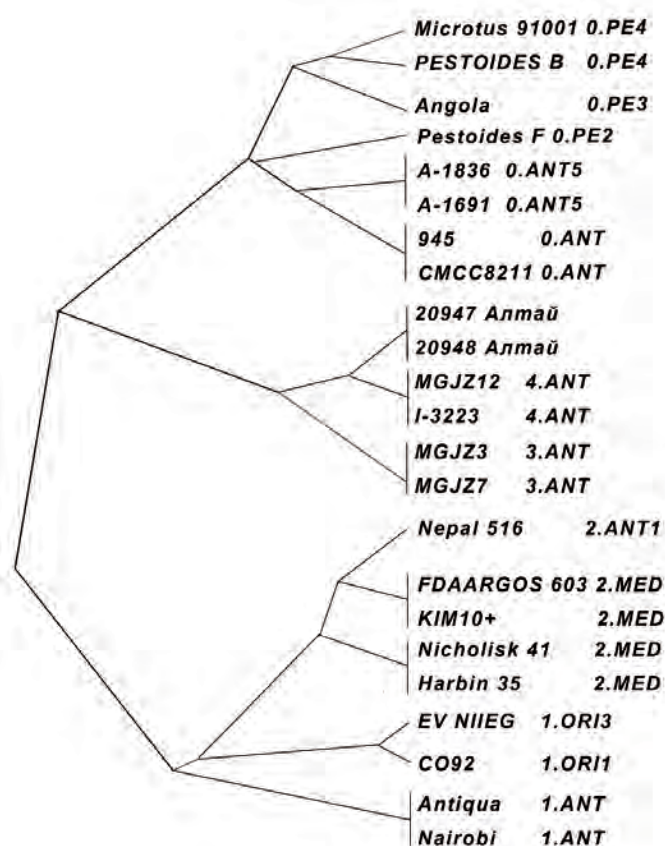


Рис. 3. Дендрограмма, построенная при использовании данных IS-генотипирования с помощью программы SRplot и алгоритма UPGMA.

Fig. 3. Dendrogram constructed using IS genotyping data using the SRplot program and the UPGMA algorithm.

щих проводить генетическую дифференциацию штаммов *Y. pestis* с помощью ПЦР, использованы для анализа полногеномных нуклеотидных последовательностей секвенированных штаммов чумного микроба с помощью компьютерной программы «YersiniaPestisAnalyze» [21]. Помимо содержащихся в программе референтных INDEL-маркеров для идентификации *Y. pestis*, в ее базу данных внесены последовательности праймеров для выявления IS-маркеров, позволяющих расширить возможности программы по определению подвидов и биоваров чумного микроба.

Эффективность программы была продемонстрирована при анализе геномов *Y. pestis* двух новых штаммов, выделенных в 2022 г. в Горно-Алтайском природном очаге чумы (*Y. pestis* 20 947 и *Y. pestis* 20 948). Для сравнения были отобраны 20 штаммов *Y. pestis*, которые принадлежат к различным подвидам и биоварам и полногеномные последовательности которых имеются в базе данных NCBI. Сравнение результатов IS-генотипирования этих штаммов *Y. pestis* показало (табл. 2), что штаммы *Y. pestis* 20 947 и 20 948 давали отрицательные результаты с праймерами tal1, tal4, tal5, tal9 и положительные – с tal18, что указывает на их принадлежность к генетической группе antiqua 4, включающей штаммы генотипа 4.ANT. Однако, в отличие от этих штаммов, *Y. pestis* 20 947 и 20 948 дают положительные результаты с праймерами tal16, что свидетельствует об их принадлежности к отдельной генетической группе, которую обозначили antiqua 8.

Полученные данные IS-генотипирования показали, что штаммы *Y. pestis* 20 947 и 20 948 отличаются от штаммов основного подвида, выделяющихся в Горно-Алтайском природном очаге чумы. Ранее считалось, что в этом очаге, помимо штаммов bv. Altaica неосновного подвида, выделяются штаммы *Y. pestis* основного подвида bv. Antiqua, которые по данным SNP-анализа относятся к генотипу 4.ANT [23]. Наши неопубликованные данные SNP-анализа этих двух штаммов также позволили отнести их к генотипу 4.ANT. Но типирование штаммов с помощью IS-маркеров дифференцирует исследованные штаммы от штаммов генотипа 4.ANT, что подтверждает их принадлежность к отдельной генетической группе.

Сравнительный анализ результатов изучения штаммов *Y. pestis*, полученных с помощью данных IS- и SNP-генотипирования. Анализ данных IS-генотипирования 23 штаммов *Y. pestis*, в т.ч. и штаммов из Горно-Алтайского очага (*Y. pestis* 20 947 и 20 948), с помощью программы SRplot и алгоритма UPGMA позволил построить дендрограмму, представленную на рис. 3.

Полученная с помощью 22 IS-маркеров дендрограмма в целом отражает закономерности, которые были ранее выявлены при SNP-типировании большого числа штаммов *Y. pestis* [24]. Так, в обеих дендрограммах прослеживается разделение штаммов по пяти ветвям дендрограммы (0, 1, 2, 3, 4), каждая из которых включает одинаковые группы штаммов. При этом не было выявлено строгих филогенетических связей между группами, сформированными из исследованных штаммов.

Надо отметить, что SNP-типирование позволяет разделить штаммы на большее количество подгрупп, так как дискриминирующая способность этого метода, основанного на использовании большого числа маркеров, выше, чем у метода IS-генотипирования, однако сравнение результатов, полученных разными методами, свидетельствует о том, что некоторые генетические группы могут быть выявлены с помощью IS-генотипирования, но не SNP-типирования. Так, штаммы CO92 и A1122 попадают в одну группу при SNP-типировании, но разделяются при IS-генотипировании. Анализ дендрограммы (рис. 3) показывает, что два новых штамма из Горно-Алтайского очага входят в один кластер со штаммами генотипов 3.ANT и 4.ANT. При этом в пределах этого кластера они образуют отдельную ветвь, что подтверждает их принадлежность к новой генетической группе штаммов *Y. pestis*.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что IS-генотипирование может служить дополнительным методом, дающим возможность уточнять связи между штаммами чумного микроба, выявленные при SNP-типировании.

## Заключение

В результате проведенных исследований выявлены IS-маркеры различных внутривидовых групп *Y. pestis*, сконструированы праймеры для их обнаружения и проведено тестирование праймеров на 109 штаммах чумного микроба с помощью ПЦР *in silico* и *in vitro*. Разработанные праймеры могут использоваться как в ПЦР *in silico* при анализе нуклеотидных последовательностей штаммов, так и в ПЦР *in vitro*

без использования секвенирования штаммов. IS-генотипирование штаммов чумного микроба с помощью ПЦР позволяет не только проводить идентификацию подвидов и биоваров, но и выявлять новые генетические группы внутри биоваров.

#### Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

#### Financial support

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

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

#### Литература

1. Kutyrev VV, Eroshenko GA, Motin VL, Nosov NY, Krasnov JM, Kukleva LM, et al. Phylogeny and Classification of *Yersinia pestis* Through the Lens of Strains From the Plague Foci of Commonwealth of Independent States. *Front Microbiol.* 2018 May 25;9:1106. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01106
2. Платонов МЕ, Евсеева ВВ, Ефременко ДВ, Кузнецова ИВ, Чиркова ЕВ, Дентовская СВ, и др. DFR-типирование штаммов *Yersinia pestis* из природных очагов СНГ. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2011;2(108):42-45.
3. Ерошенко ГА, Одинокоев ГН, Куклева ЛМ, Павлова АИ, Краснов ЯМ, Шавина НЮ, и др. Стандартный алгоритм молекулярного типирования штаммов *Yersinia pestis*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2012;3:25-35.
4. Сучков ИЮ, Мишанькин БН, Смоликова ЛМ, Шишияну МВ. Генотипирование *Yersinia pestis*: варибельность локуса (CAAA)<sub>n</sub> у природных штаммов, выделенных на территории бывшего СССР. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2002;4:18-21.
5. Евсеева ВВ, Платонов МЕ, Говорунов ИГ, Ефременко ДВ, Кузнецова ИВ, Дентовская СВ, и др. Сравнительный анализ MLVA25- и MLVA7-типирования по способности определять очаговую принадлежность штаммов *Yersinia pestis* на примере изолятов из Центрально-Кавказского высокогорного очага чумы. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2016;1:37-40.
6. Vogler AJ, Andrianaivoarimanana V, Telfer S, Hall CM, Sahl JW, Nepp CM, et al. Temporal phylogeography of *Yersinia pestis* in Madagascar: Insights into the long-term maintenance of plague. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Sep 5;11(9):e0005887. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005887
7. Куклева ЛМ, Джапарова АК, Оглодин ЕГ, Нарышкина ЕА, Краснов ЯМ, Кузнецов АА, и др. Комплексная характеристика штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в Сарыджазском и Верхненарынском высокогорных очагах в 2019–2020 гг. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2021;2:114-122. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-114-122
8. Ярыгина МБ, Витязева СА, Корзун ВМ, Тунгалаг Х, Цэрэнноров Д, Балахонов СВ. Пространственная MLVA25-генотипическая структура *Yersinia pestis* ssp. *pestis* в трансграничном Сайлюгемском природном очаге чумы. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2022;4:110-116. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-110-116
9. Оглодин ЕГ, Одинокоев ГН, Никифоров КА, Куклева ЛМ, Ерошенко ГА. Определение геновариантов штаммов *Yersinia pestis* основного подвида методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2014;4:52-55. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-4-52-55
10. Никифоров КА, Одинокоев ГН, Новичкова ЛА, Ерошенко ГА. Дифференциация штаммов *Yersinia pestis* Алтайско-Гиссарской группы неосновных подвигов методом ПЦР. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2015;1:71-74. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-1-71-74
11. Кисличкина АА, Кадникова ЛА, Платонов МЕ, Майская НВ, Коломбет ЛВ, Соломенцев ВИ, и др. Дифференциация штаммов *Yersinia pestis* основного, неосновного подвигов и других представителей *Yersinia pseudotuberculosis* complex. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2017;35(2):43-48. DOI 10.18821/0208-0613-2017-35-2-43-48
12. Бобров АГ, Филиппов АА. Распространенность IS285 и IS100 в геномах *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 1997;2:36-40.
13. Huang X-Z, Chu MC, Engelthaler DM, Lindler LE. Genotyping of a homogeneous group of *Yersinia pestis* strains isolated in the United States. *J Clin Microbiol.* 2002;40(4):1164-73. DOI: 10.1128/JCM.40.4.1164-1173.2002
14. Torrea G, Chenal-Francisque V, Leclercq A, Carniel E. Efficient tracing of global isolates of *Yersinia pestis* by restriction fragment length polymorphism analysis using three insertion sequences as probes. *J Clin Microbiol.* 2006 Jun;44(6):2084-92. DOI: 10.1128/JCM.02618-05
15. Leclercq AJ, Torrea G, Chenal-Francisque V, Carniel E. 3 IS-RFLP: a powerful tool for geographical clustering of global isolates of *Yersinia pestis*. *Adv Exp Med Biol.* 2007;603:322-6. DOI: 10.1007/978-0-387-72124-8\_29
16. Motin VL, Georgescu AM, Elliott JM, Hu P, Worsham PL, Ott LL, et al. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (glpD). *J Bacteriol.* 2002 Feb;184(4):1019-27. DOI: 10.1128/jb.184.4.1019-1027.2002
17. Achtman M, Morelli G, Zhu P, Wirth T, Diehl I, Kusecek B, et al. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004 Dec 21;101(51):17837-42. DOI: 10.1073/pnas.0408026101
18. Chain PS, Hu P, Malfatti SA, Radnedge L, Larimer F, Vergez LM, Worsham P, et al. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strains Antiqua and Nepal516: evidence of gene reduction in an emerging pathogen. *J Bacteriol.* 2006 Jun;188(12):4453-63. DOI: 10.1128/JB.00124-06
19. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Под ред. академика РАМН Онищенко ГГ, академика РАМН Кутырева ВВ. Изд. 2-е, перераб. и доп. М.: ЗАО «Шико», 2013.
20. Водопьянов АС, Трухачев АЛ, Подладчикова ОН, Писанов ПВ. ContigSearcher – программа для анализа результатов полногеномного секвенирования, определения наличия последовательностей различных генов в контигах, полученных при секвенировании, выявления INDEL-мутаций. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2018611348 от 01.02.2018.
21. Трухачев АЛ, Водопьянов АС, Ерошенко ГИ, Подладчикова ОН, Мелоян МГ, Кузнецова ДА, и др. Программа «YersiniaPestisAnalyzer» для анализа результатов полногеномного секвенирования. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ №2021668184 от 10.11.2021.
22. Achtman M. Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol.* 2008;62:53-70. DOI: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162832
23. Ерошенко ГА, Попов НВ, Краснов ЯМ, Никифоров КА, Кузнецов АА, Матросов АН, и др. Природный мегаочаг основного подвида *Yersinia pestis* античного биовара филогенетической ветви 4.ANT в Горном Алтае. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2018;2:49-56. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-49-56
24. Cui Y, Yu C, Yan Y, Li D, Li Y, Jombart T, et al. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013 Jan 8;110(2):577-82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110

## References

- Kutyrev VV, Eroshenko GA, Motin VL, Nosov NY, Krasnov JM, Kukleva LM, et al. Phylogeny and Classification of *Yersinia pestis* Through the Lens of Strains From the Plague Foci of Commonwealth of Independent States. *Front Microbiol.* 2018 May 25;9:1106. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01106
- Platonov ME, Evseeva VV, Efremenko DV, Kuznetsova IV, Chirkova EV, Dentovskaya SV, et al. DFR-tipirovanie shtammov *Yersinia pestis* iz prirodnykh ochagov SNG. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2011;2(108):42-45. (In Russian).
- Eroshenko GA, Odinokov GN, Kukleva LM, Pavlova AI, Krasnov YaM, Shavina NYu, et al. Standartnyi algoritm molekulyarnogo tipirovaniya shtammov *Yersinia pestis*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2012;3:25-35. (In Russian).
- Suchkov IYu, Mishan'kin BN, Smolikova LM, Shishiyanu MV. Genotipirovanie *Yersinia pestis*: variabel'nost' lokusa (SAAA)n u prirodnykh shtammov, vydelenykh na territorii byvshego SSSR. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2002;4:18-21. (In Russian).
- Evseeva VV, Platonov ME, Govorunov IG, Efremenko DV, Kuznetsova IV, Dentovskaya SV, et al. Sravnitel'nyi analiz MLVA25- i MLVA7-tipirovaniya po sposobnosti opredelyat' ochagovuyu prinadlezhnost' shtammov *Yersinia pestis* na primere izolyatov iz tsentral'no-Kavkazskogo vysokogornogo ochaga chumy. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2016;1:37-40. (In Russian).
- Vogler AJ, Andrianaivoarimanana V, Telfer S, Hall CM, Sahl JW, Hepp CM, et al. Temporal phylogeography of *Yersinia pestis* in Madagascar: Insights into the long-term maintenance of plague. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Sep 5;11(9):e0005887. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005887
- Kukleva LM, Dzhaparova AK, Oglodin EG, Naryshkina EA, Krasnov YaM, Kuznetsov AA, et al. Complex Characteristics of *Yersinia pestis* Strains Isolated in the Sarydzhas and Upper-Naryn High-Mountain Foci in 2019–2020. *Problemy osobo opasnykh infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections).* 2021;2:114-122. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-114-122 (In Russian).
- Yarygina MB, Vityazeva SA, Korzun VM, Tungalag H, Tserennorov D, Balakhonov SV. *Yersinia pestis* ssp. *pestis* Spatial MLVA25 Genotypic Structure in the Transboundary Saylyugem Natural Plague Focus. *Problemy osobo opasnykh infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections).* 2022;4:110-116. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-110-116 (In Russian).
- Oglodin EG, Odinokov GN, Nikiforov KA, Kukleva LM, Eroshenko GA. Identification of Genovariants of *Yersinia pestis* Strains Belonging to Main Subspecies Using PCR with Hybridization-Fluorescent Registration of Results. *Problemy osobo opasnykh infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections).* 2014;4:52-55. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-4-52-55 (In Russian).
- Nikiforov KA, Odinokov GN, Novichkova LA, Eroshenko GA. Differentiation between *Yersinia pestis* Strains of Altaic-Hissar Group of Non-Main Subspecies by Means of PCR. *Problemy osobo opasnykh infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections).* 2015;1:71-74. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-1-71-74 (In Russian).
- Kislichkina AA, Kadnikova LA, Platonov ME, Maiskaya NV, Kolombet LV, Solomentsev VI, et al. Differentsiatsiya shtammov *Yersinia pestis* osnovnogo, neosnovnogo podvidov i drugikh predstavitelei *Yersinia pseudotuberculosis* complex. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2017;35(2):43-48. DOI 10.18821/0208-0613-2017-35-2-43-48 (In Russian).
- Bobrov, AG, Filippov AA. Rasprostranennost' IS285 i IS100 v genomakh *Yersinia pestis* i *Yersinia pseudotuberculosis*. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 1997;2:36-40. (In Russian).
- Huang X-Z, Chu MC, Engelthaler DM, Lindler LE. Genotyping of a homogeneous group of *Yersinia pestis* strains isolated in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40(4):1164-73. DOI: 10.1128/JCM.40.4.1164-1173.2002
- Torrea G, Chenal-Francisque V, Leclercq A, Carniel E. Efficient tracing of global isolates of *Yersinia pestis* by restriction fragment length polymorphism analysis using three insertion sequences as probes. *J Clin Microbiol.* 2006 Jun;44(6):2084-92. DOI: 10.1128/JCM.02618-05
- Leclercq AJ, Torrea G, Chenal-Francisque V, Carniel E. 3 IS-RFLP: a powerful tool for geographical clustering of global isolates of *Yersinia pestis*. *Adv Exp Med Biol.* 2007;603:322-6. DOI: 10.1007/978-0-387-72124-8\_29
- Motin VL, Georgescu AM, Elliott JM, Hu P, Worsham PL, Ott LL, et al. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (glpD). *J Bacteriol.* 2002 Feb;184(4):1019-27. DOI: 10.1128/jb.184.4.1019-1027.2002
- Achtman M, Morelli G, Zhu P, Wirth T, Diehl I, Kusecek B, et al. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004 Dec 21;101(51):17837-42. DOI: 10.1073/pnas.0408026101
- Chain PS, Hu P, Malfatti SA, Radnedge L, Larimer F, Vergez LM, Worsham P, et al. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strains Antiqua and Nepal516: evidence of gene reduction in an emerging pathogen. *J Bacteriol.* 2006 Jun;188(12):4453-63. DOI: 10.1128/JB.00124-06
- Laboratornaya diagnostika opasnykh infektsionnykh boleznei. *Prakticheskoe rukovodstvo.* Pod red. akademika RAMN Onishchenko GG, akademika RAMN Kutyreva VV. Izd. 2-e, pererab. i dop. M.: ZAO «Shiko», 2013. (In Russian).
- Vodop'yanov AS, Trukhachev AL, Podladchikova ON, Pisanov RV. SontigSearcher – programma dlya analiza rezul'tatov polnogenomnogo sekvenirovaniya, opredeleniya nalichiya posledovatel'nostei razlichnykh genov v kontigakh, poluchennykh pri sekvenirovanii, vyyavleniya INDEL-mutatsii. *Svidetel'stvo o gosudarstvennoi registratsii programmy dlya EVM №2018611348 ot 01.02.2018.* (In Russian).
- Trukhachev AL, Vodop'yanov AS, Eroshenko GI, Podladchikova ON, Meloyan MG, Kuznetsova DA, et al. Programma «YersiniaPestisAnalyzer» dlya analiza rezul'tatov polnogenomnogo sekvenirovaniya. *Svidetel'stvo o registratsii programmy dlya EVM №2021668184 ot 10.11.2021.* (In Russian).
- Achtman M. Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol.* 2008;62:53-70. DOI: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162832
- Eroshenko GA, Popov NV, Krasnov YaM, Nikiforov KA, Kuznetsov AA, Matrosov AN, et al. Natural Mega-Focus of *Yersinia pestis* Main Subspecies, Antique Biovar, Phylogenetic Line 4.ANT in Gorny Altai. *Problemy osobo opasnykh infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections).* 2018;2:49-56. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-49-56 (In Russian).
- Cui Y, Yu C, Yan Y, Li D, Li Y, Jombart T, et al. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013 Jan 8;110(2):577-82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110

## Информация о соавторах:

Мелоян Мисак Геворгович, младший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

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

Подладчикова Ольга Николаевна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Ковалевич Алексей Александрович, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Темякова Светлана Юрьевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора



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

Кузнецова Дарья Александровна, научный сотрудник лаборатории экспериментально-биологических моделей и биологической безопасности ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Рыкова Виолетта Александровна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Базарова Галина Хамроевна, кандидат медицинских наук, врач-бактериолог высшей квалификационной категории, заведующая бактериологической лабораторией ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Югушев Арчин Юрьевич, врач-бактериолог ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Рождественский Евгений Николаевич, директор ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора.

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

#### Information about co-authors:

Misak G. Meloyan, Junior Researcher of the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

Aleksey S. Vodopyanov, MD, PhD, Leading Researcher of the Laboratory of Molecular Biology of Natural Focal and Zoonotic Infections of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

Olga N. Podladchikova, PhD in Chemical Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

Alexey A. Kovalevich, Junior Researcher of the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

Svetlana Y. Temyakova, Junior Researcher of the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

Ruslan V. Pisanov, PhD in Biological Sciences, HEAD of the Laboratory of Molecular Biology of Natural Focal and Zoonotic Infections of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

Daria A. Kuznetsova, Researcher of the Laboratory of Experimental Biological Models and Biological Safety of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

Violetta A. Rykova, PhD in Biological Sciences, Researcher of the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

Galina Kh. Bazarova, MD, PhD, Bacteriologist, Head of Bacteriological Laboratory of Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор

Archin Yu. Yugushev, Bacteriologist of Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор

Evgeny N. Rozhdestvensky, Director of Altai Anti-Plague Station of Rosпотребнадзор

Aleksey K. Noskov, Director of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

## НОВОСТИ НАУКИ

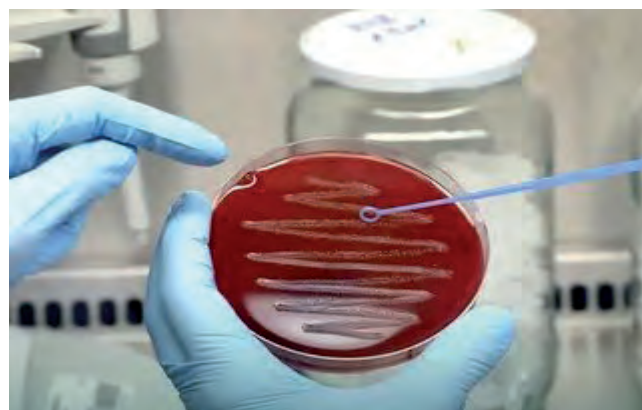
### Новый синтетический антибиотик

Группа исследователей разработала упрощенные синтетические версии природной молекулы теиксобактина, которая используется бактериями-продуцентами для уничтожения других бактерий в почве.

Ученые разработали и синтезировали высокоэффективные аналоги теиксобактина, заменив ключевой строительный блок L-алло-эндурацидин на коммерчески доступные недорогие упрощенные строительные блоки, такие как непротеогенные аминокислоты. В результате аналоги стали эффективны против широкого спектра устойчивых бактериальных патогенов, включая бактериальные изоляты от пациентов и бактериальные биопленки.

Это еще один важный шаг в адаптации природной молекулы теиксобактина, чтобы сделать ее пригодной для использования человеком.

Молекулы теиксобактина способны предложить новые варианты лечения бактериальных инфекций с множественной лекарственной устойчивостью и инфекций, связанных с биопленками, что позволит улучшить и спасти жизни людей во всем мире. Эта работа закладывает многообещающую основу для дальнейших исследований и открывает возможности для изучения применения теиксобактина в различных ситуациях, связанных с биопленками, включая инфекции в области хирургии, операций, связанных с имплантатами, и пациентов с мукковисцидозом.



*Parmar A, Lakshminarayanan R, Iyer A, Goh ETL, To TY, Yam JKH, et al. Development of teixobactin analogues containing hydrophobic, non-proteogenic amino acids that are highly potent against multidrug-resistant bacteria and biofilms. Eur J Med Chem. 2023 Dec 5;261:115853. DOI: 10.1016/j.ejmech.2023.115853*

# Анализ генетических детерминант антибиотикорезистентности *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> и *bla*<sub>OXA-48</sub>, выделенных из штаммов, входящих в группу ESKAPE

А.В.Устюжанин<sup>1</sup>, Г.Н.Чистякова<sup>1</sup>, И.И.Ремизова<sup>1</sup>, А.Э.Первушина<sup>2</sup>, А.П.Шитова<sup>2</sup>, А.А.Маханёк<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Уральский НИИ охраны материнства и младенчества» Минздрава России, Екатеринбург, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ГБУЗ Свердловской области «Центральная городская больница №2 им. А.А.Миславского», Екатеринбург, Российская Федерация

Формирование устойчивости к антимикробным препаратам у представителей энтеробактерий и неферментирующих грамотрицательных бактерий является серьезной проблемой для отечественных и зарубежных систем здравоохранения. Изучение механизмов формирования антибиотикорезистентности является одним из подходов к сдерживанию дальнейшего увеличения количества устойчивых к антибиотикам штаммов микроорганизмов.

**Цель исследования:** изучить молекулярные механизмы антибиотикорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* и типировать выявленные генетические детерминанты устойчивости к антибиотикам. **Результаты.** Проведенный анализ нуклеотидной последовательности гена *bla*<sub>NDM</sub> штамма, выделенного в 2021 г. в Екатеринбурге, задепонированной в международной базе генетической информации GeneBank под номером ON023485, показал ее принадлежность к самому распространенному варианту NDM-1. Молекулярно-генетический анализ позволил установить, что 6 из 10 генов *bla*<sub>CTX-M</sub> принадлежали варианту *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Другие последовательности относились к *bla*<sub>CTX-M-14</sub>.

**Ключевые слова:** *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>

**Для цитирования:** Устюжанин А.В., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., Первушина А.Э., Шитова А.П., Маханёк А.А. Анализ генетических детерминант антибиотикорезистентности *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> и *bla*<sub>OXA-48</sub>, выделенных из штаммов, входящих в группу ESKAPE. Бактериология. 2024; 9(1): 81–86. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-81-86

## Analysis of genetic determinants of antibiotic resistance *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> и *bla*<sub>OXA-48</sub> isolated from strains included in the ESKAPE group

A.V.Ustyuzhanin<sup>1</sup>, G.N.Chistyakova<sup>1</sup>, I.I.Remizova<sup>1</sup>, A.E.Pervushina<sup>2</sup>, A.P.Shitova<sup>2</sup>, A.A.Makhanyok<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Urals Scientific Research Institute for Maternal and Child Care, Ministry of Healthcare of Russian Federation, Yekaterinburg, Russian Federation;

<sup>2</sup>A.A.Mislavsky Central City Hospital No 2, Yekaterinburg, Russian Federation

The development of resistance to antimicrobial drugs in representatives of enterobacteriaceae and non-fermenting gram-negative bacteria is a serious problem for healthcare systems around the world. Studying the mechanisms of antibiotic resistance formation is one of the approaches to curbing the further increase in the number of antibiotic-resistant strains of microorganisms.

**Purpose of the study:** to study the molecular mechanisms of antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* strains and to type the identified genetic determinants of antibiotic resistance.

**Results.** An analysis of the nucleotide sequence of the *bla*<sub>NDM</sub> gene of the strain isolated in 2021 in Yekaterinburg, deposited in the international genetic information database GeneBank under the number ON023485, showed that it belongs to the most common variant of NDM-1. Molecular genetic analysis revealed that 6 out of 10 *bla*<sub>CTX-M</sub> genes belonged to the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> variant. Other sequences belonged to *bla*<sub>CTX-M-14</sub>.

**Key words:** *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>

**For citation:** Ustyuzhanin A.V., Chistyakova G.N., Remizova I.I., Pervushina A.E., Shitova A.P., Makhanyok A.A. Analysis of genetic determinants of antibiotic resistance *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> и *bla*<sub>OXA-48</sub> isolated from strains included in the ESKAPE group. Bacteriology. 2024; 9(1): 81–86. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-81-86

### Для корреспонденции:

Устюжанин Александр Владимирович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник научного отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ «Уральский НИИ охраны материнства и младенчества» Минздрава России

Адрес: 620028, Екатеринбург, ул. Репина, 1

Статья поступила 02.10.2023, принята к печати 29.03.2024

### For correspondence:

Alexander V. Ustyuzhanin, PhD, MD, Senior Researcher of the Department of Immunology, Microbiology, Pathomorphology and Cytodiagnosics, Urals Scientific Research Institute for Maternal and Child Care

Address: 1 Repin str., Yekaterinburg, 620028, Russian Federation

The article was received 02.10.2023, accepted for publication 29.03.2024

**А**нтибиотики (АБ) группы карбапенемов являются резервными препаратами антибиотикотерапии, используемыми чаще всего в реанимационных, ожоговых, неврологических, хирургических и других отделениях с целью эрадикации антибиотикорезистентных возбудителей инфекционных заболеваний. Формирование устойчивости к АБ у представителей энтеробактерий и неферментирующих грамотрицательных бактерий является серьезной проблемой для отечественных и зарубежных систем здравоохранения [1–3].

Антибиотикорезистентность бактерий к препаратам различных групп обусловлена реализацией одного (изменение мишени) или нескольких механизмов (выработка ферментов и уменьшение проницаемости клеточной стенки за счет изменения пространственной конфигурации поринового белка) [4]. Одним из самых распространенных механизмов является способность бактерий продуцировать ферменты, в частности β-лактамазы и карбапенемазы.

Среди генов β-лактамаз ген *bla*<sub>CTX-M</sub>, определяющий синтез цефотаксимаз, является наиболее распространенным. Он доминирует среди детектируемых генов у представителей семейства *Enterobacteriaceae* в Индии [5], России, странах Европы и Америки [6]. В статье K.Alcedo et al. указано на значительное увеличение носительства генов β-лактамаз расширенного спектра действия (БЛРС), в частности *bla*<sub>CTX-M</sub> среди штаммов *Escherichia coli* в кишечнике клинически здоровых детей сельской местности Перу. Доля описанных штаммов в 2002 г. составляла 0,1%, а в 2022 г. превысила 50% [7].

Карабапенемазы функционально разделены на две группы – серинзависимые (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>) и металло-β-лактамазы (*bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IPM</sub> и *bla*<sub>NDM</sub>). Металло-β-лактамаза Нью-Дели (NDM) – это новейшая карбапенемаза, которая гидролизует все β-лактамы антибиотиков, кроме монобактамов (азтреонам). В настоящее время выделяют несколько групп этого фермента, отличающихся друг от друга аминокислотными заменами [8]. Бактериальные штаммы, продуцирующие ген *bla*<sub>NDM-5</sub>, были выделены в Китае из мокроты пациента [9] и из водных объектов окружающей среды, что подтверждает их широкое распространение за пределами лечебных учреждений [10].

Ген *bla*<sub>OXA-48</sub> кодирует ферменты, называемые оксациллиназами или ОХА-β-лактамазами из-за их способности гидролизовать оксациллин. Эти ферменты были впервые обнаружены в 1960–1970-х гг. Они активно разрушали пенициллин и оксациллин. Затем были описаны варианты ОХА-β-лактамазы, которые инактивировали другую группу антибиотиков – цефалоспорины и карбапенемы. В настоящее время описано более 750 вариантов ОХА-β-лактамаз, среди которых ОХА-48 является самой распространенной [11]. При исследовании, проведенном в Москве, установлено, что *bla*<sub>OXA-48</sub> доминировал среди штаммов *Klebsiella pneumoniae* и выявлялся в 47,1% случаев [12]. В то же время показано, что среди штаммов, выделенных в 2012–2014 гг. в Северо-Западном медицинском исследовательском центре им. В.А.Алмазова (Санкт-Петербург), указанный ген был детектирован лишь в 29,0% [13]. Результаты исследования Y.Sun et al. демонстрируют возможность быстрого распространения гена *bla*<sub>OXA-48</sub> среди широкого круга хозяев [14].

Передача генов, обеспечивающих устойчивость к широкому спектру антибактериальных препаратов, относящихся к различным фармакологическим группам, приводит к возникновению штаммов с множественной лекарственной устойчивостью, которые часто являются возбудителями зоокоммиальных инфекций.

Одним из самых распространенных представителей энтеробактерий, регистрируемых в качестве этиологического агента инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, является *K. pneumoniae* [5]. В настоящее время в литературе описано формирование вариантов бактерий, в которых одновременно выявлены гены антибиотикорезистентности и вирулентности *K. pneumoniae*. В связи с тем, что генетические детерминанты этих признаков локализованы в плазмидах, существует высокий риск реализации рекомбинации и распространения вариантов микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью и большим патогенным потенциалом. Такие варианты уже были выделены в крупных лечебных учреждениях на территории Российской Федерации [15].

Изучение механизмов формирования антибиотикорезистентности является одним из подходов к сдерживанию дальнейшего увеличения количества устойчивых к АБ штаммов.

**Цель исследования:** изучить молекулярные механизмы антибиотикорезистентности штаммов *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* и типировать выявленные генетические детерминанты устойчивости к антибиотикам.

## Материалы и методы

Исследование проводилось в лаборатории иммунологии и клинической микробиологии ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России. Штаммы были выделены в период 2019–2021 гг. из проб биологического материала пациентов, госпитализированных в педиатрические, акушерско-гинекологические отделения перинатального центра и в терапевтические отделения ГБЦ №2 г. Екатеринбурга. Краткая характеристика штаммов представлена в табл. 1.

С целью проведения исследования биологический материал был доставлен в лабораторию в соответствии с СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», утвержденными Постановлением Главного Государственного санитарного врача РФ №62500 от 15.02.2021. Посев производился на дифференциально-диагностическую питательную среду Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, пос. Оболенск, Россия) для выделения энтеробактерий и на кровяно-сывороточный агар (основа-HiMedia, Индия; эритроциты барана, ЗАО «ЭКОлаб»; сыворотка крови крупного рогатого скота, ООО «БиолоТ», Россия) для определения гемолитической активности выделенных изолятов. Видовую идентификацию чистой культуры бактерий, определение антибиотикочувствительности микроорганизмов проводили на автоматическом бактериологическом анализаторе VITEK 2 Compact (Bio Mérieux, Франция, входит в перечень оборудования ЦКП «Инновационный научно-лабораторный центр перинатальной и репродуктивной медицины» ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава

Таблица 1. Характеристика штаммов, включенных в исследование  
 Table 1. Characteristics of the strains included in the study

№ п/п	Вид микроорганизма / Type of microorganism	Материал для исследования / Material for research	Возраст пациента / Patient's age	Отделение / Department
	<i>K. pneumoniae</i>	Моча / Urine	68 лет / 68 years old	Терапевтическое / Therapeutic
	<i>A. baumannii</i>	Мокрота / Sputum	37 лет / 37 years	Терапевтическое / Therapeutic
	<i>K. pneumoniae</i>	Отделяемое цервикального канала / Cervical discharge	27 лет / 27 years	Родовое / Maternity ward
	<i>K. pneumoniae</i>	Отделяемое цервикального канала / Cervical discharge	24 года / 24 years old	Послеродовое / Postpartum
	<i>K. pneumoniae</i>	Фекалии / Feces	19 лет / 19 years	Родовое / Maternity ward
	<i>K. pneumoniae</i>	Фекалии / Feces	17 суток / 17 days	Патологии новорожденных / Pathologies of newborns
	<i>K. pneumoniae</i>	Фекалии / Feces	16 суток / 16 days	Патологии новорожденных / Pathologies of newborns
	<i>K. pneumoniae</i>	Фекалии / Feces	46 суток / 46 days	Патологии новорожденных / Pathologies of newborns
	<i>K. pneumoniae</i>	Фекалии / Feces	46 суток / 46 days	Патологии новорожденных / Pathologies of newborns
	<i>K. pneumoniae</i>	Фекалии / Feces	48 суток / 48 days	Патологии новорожденных / Pathologies of newborns
	<i>E. coli</i>	Фекалии / Feces	9 суток / 9 days	Патологии новорожденных / Pathologies of newborns
	<i>E. coli</i>	Отделяемое цервикального канала / Cervical discharge	30 лет / 30 years	Патологии беременных / Pathologies of pregnant women

России) согласно инструкции производителя с использованием карт VITEK 2 GN (установление вида) и VITEK AST-N101 и VITEK AST-N360 (определение антибиотикочувствительности). ДНК бактериальных клеток выделяли из 18-часовой культуры микроорганизмов, выращенной при 37°C с помощью набора «Проба-экспресс» (ООО «Синтол») согласно инструкции производителя. Выявление генов *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IPM</sub> и *bla*<sub>NDM</sub> осуществляли с помощью наборов реагентов «АмплиСенс® MDR MBL-FL», «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL» (производства ООО «ИЛС», Россия). Детекцию генов *bla*<sub>CTX-M</sub> осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I (ООО «Синтол») на детектирующем амплификаторе «ДТ Лайт» («ДНК-технология», Россия). Состав реакционной смеси представлен следующими компонентами: 2,5x ПЦР буфер Б (KCl, TrisHCl (pH 8,8), 6,25 mM MgCl<sub>2</sub>), SynTaq ДНК-полимераза, дезоксинуклеозидтрифосфаты, глицерол, Tween 20; 1 мкл 25mM MgCl<sub>2</sub>, 5 мкл dd H<sub>2</sub>O, по 1 мкл каждого праймера и 2 мкл образца ДНК. Режим амплификации: первоначальная денатурация проводилась при температуре 95°C в течение 2 мин, затем следовало 30 циклов: денатурация при температуре 94°C в течение 15 с; отжиг праймеров при температуре 58°C для *bla*<sub>CTX</sub> 20 с; элонгация при темпе-

ратуре 72°C в течение 30 с; в конце каждого цикла – детекция продуктов амплификации.

Для последующего секвенирования использовали праймеры, указанные в табл. 2.

Секвенирование генов проводили по методу Сенгенра [16]. Типирование полученных последовательностей осуществляли с использованием Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## Результаты исследования и их обсуждение

Фенотипический профиль резистентности к АБ штаммов и генетические детерминанты антибиотикорезистентности указаны в табл. 3.

Устойчивость к препаратам резерва проявляли штаммы *K. pneumoniae* 3043 и *A. baumannii* 205. Другие микроорганизмы, включенные в исследование, были чувствительны к указанным лекарственным средствам.

Сочетание генетических детерминант карбапенемаз молекулярного класса D (OXA-48) и молекулярного класса B (NDM), обеспечивающих устойчивость к действию АБ группы карбапенемов, выявлено в штамме *K. pneumoniae*. Аналогичная комбинация β-лактамаз была определена в 0,3% случаев (8 штаммов *K. pneumoniae*) при проведении многоцентрового исследования МАРАФОН 2015-2016 [17].

Проведенный анализ нуклеотидной последовательности гена *bla*<sub>NDM</sub> штамма, выделенного в 2021 г. в Екатеринбурге, депонированной в международной базе генетической информации GeneBank под номером ON023485, показал ее принадлежность к самому распространенному варианту NDM-1 [18]. Также установлена идентичность с последовательностями, полученными в России в 2012 г. (KC178689) и 2017 г. (CP072809), локализованными в гибридных плазмидах вирулентности и антибиотикорезистентности [15].

Четыре из анализируемых штаммов кроме устойчивости к β-лактамам антибиотикам проявляли резистентность к аминогликозидам (табл. 3). При этом штамм *K. pneumoniae* 3043 был резистентен к амикацину, сохраняя чувствитель-

Таблица 2. Последовательности праймеров, используемых для секвенирования нуклеотидных последовательностей генов

Table 2. Sequences of primers used for sequencing the nucleotide sequences of genes

№ п/п	Ген / Gene	Праймер / Primer	Последовательность нуклеотидов праймера / Primer nucleotide sequence
1.	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	NDM-F	5'-GAAGCTGAGCACCGCATTAG-3'
		NDM-R	5'-GGGCCGTATGAGTGATTGC-3'
2.	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	OXA-48-F	5'-TTGGTGGCATCGATTATCGG-3'
		OXA-48-R	5'-GAGCACTTCTTTTGTGATGGC-3'
3.	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	CTX-M-F	5'-TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA-3'
		CTX-M-R	5'-CTCCGCTGCCGGTTTTATC-3'

Таблица 3. Фенотипические профиль антибиотикорезистентности и аллельная принадлежность генетических детерминант устойчивости к антибиотикам  
 Table 3. Phenotypic profile of antibiotic resistance and allelic affiliation of genetic determinants of antibiotic resistance

№ п/п	Вид микроорганизма / Microorganism	№ штамма / Strain number	Дата выделения / Date of isolation	Гены AMP / AMR genes	AMP	AMC	CTX	CAZ	FEP	ERT	MEM	AK	GEN	CIP	Col	Trim
1	<i>K. pneumoniae</i>	3043	30.09.2021	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	≥32	R ≥32	R ≥64	R ≥64	R ≥32	R ≥8	R ≥16	R 16	R ≤1	S ≥4	R ≤0,5	S ≥320
2	<i>A. baumannii</i>	205	06.10.2021	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	≥32	R ≥32	R ≥64	R ≥64	R ≥32	R .	R ≥16	R ≤2	S ≤1	S ≥4	R ≤0,5	S ≤20
3	<i>K. pneumoniae</i>	517	04.05.2021	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	≥32	R 8	S ≥64	R 8	R ≥64	R ≤0,5	S ≤1	S ≤2	S ≤1	S 1	R ≤0,5	S ≥320
4	<i>K. pneumoniae</i>	515	04.05.2021	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	≥32	R ≥32	R ≥64	R 8	R 2	I ≤0,5	S ≤1	S ≤2	S ≤1	S 1	R ≤0,5	S ≥320
5	<i>K. pneumoniae</i>	512	19.03.2021	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	≥32	R ≥32	R ≥64	R 8	R 2	I ≤0,5	S ≤1	S ≤2	S ≤1	S 1	R ≤0,5	S ≥320
6	<i>K. pneumoniae</i>	491	09.03.2021	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	≥32	R 8	S ≥64	R 8	R 2	I ≤0,5	S ≤1	S ≤2	S ≤1	S 0,25	S ≤0,5	S ≥320
7	<i>K. pneumoniae</i>	458	19.01.2021	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	≥32	R ≥32	R ≥64	R ≥64	R ≥64	R ≤0,5	S ≤1	S ≤2	S ≤1	S ≥4	R ≤0,5	S ≥320
8	<i>K. pneumoniae</i>	195	10.02.2020	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	≥32	R ≥32	R ≥64	R ≤1	S 2	I ≤0,5	S ≤1	S ≤2	S ≥16	R 0,5	I ≤0,5	S 40
9	<i>K. pneumoniae</i>	207	13.02.2020	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	≥32	R 16	R 32	R ≤1	S 2	I ≤0,5	S ≤1	S ≤2	S ≥16	R 0,5	I ≤0,5	S 40
10	<i>K. pneumoniae</i>	196	13.02.2020	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	≥32	R ≥32	R 32	R ≤1	S 2	I ≤0,5	S ≤1	S ≤2	S ≥16	R 0,5	I ≤0,5	S 40
11	<i>E. coli</i>	225	17.02.2020	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	≥32	R 4	S ≥64	R 4	I 4	I ≤0,5	S ≤1	S ≤2	S ≤1	S ≥4	R ≤0,5	S ≤20
12	<i>E. coli</i>	72	08.08.2019	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	≥32	R ≥32	R ≥64	R ≥64	R ≥64	R ≤0,5	S ≤1	S ≤2	S ≤1	S ≥4	R ≤0,5	S ≤20

AMP – ампициллин (Ampicillin), AMC – амоксициллин/клавуланат (Amoxicillin/clavulanate), CTX – цефотаксим (Cefotaxime), CAZ – цефтазидим (Ceftazidime), FEP – цефепим (Cefepime), ERT – эртапенем (Ertapenem), MEM – меропенем (Meropenem), AK – амикацин (Amikacin), GEN – гентамицин (Gentamicin), CIP – ципрофлоксацин (Ciprofloxacin), Col – колистин (Colistin), Trim – триметоприм/сульфаметоксазол (Trimethoprim/sulfamethoxazole).

ность к гентамицину, а *K. pneumoniae* 195, 207, 196, наоборот, сформировали устойчивость к гентамицину, демонстрируя чувствительность к амикацину. В 66,7% случаев фенотипически установлена устойчивость к ципрофлоксацину из группы фторхинолонов и в 50% – к триметоприму/сульфаметоксазолу.

В лаборатории ФГБУ «НИИ ОММ» были секвенированы и получены нуклеотидные последовательности 10 генов *bla*<sub>CTX-M</sub>, детектированных в 2 штаммах *E. coli* и 8 штаммах *K. pneumoniae*. Штаммы *E. coli* выделены из отделяемого цервикального канала пациентки в возрасте 30 лет, госпитализированной в отделение патологии беременности в 27 нед. с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом, и из фекалий новорожденного ребенка. Другие 8 штаммов, несущие ген *bla*<sub>CTX-M</sub>, представлены *K. pneumoniae*, шесть из которых выделены из фекалий новорожденных детей и одной пациентки родового отделения, два – из отделяемого цервикального канала.

Проведенный молекулярно-генетический анализ позволил установить, что 6 из 10 генов *bla*<sub>CTX-M</sub> принадлежали варианту *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (генетическая группа CTX-M-1). Аналогичный вариант гена был детектирован в штаммах *K. pneumoniae* и *E. coli*, колонизирующих кишечник новорожденных детей, при проведении обследования 231 новорожденного в период 2017–2018 гг. в Сербии [19]. Ген *bla*<sub>CTX-M-15</sub> доминировал среди уропатогенных *E. coli* в Нигерии [20] и преобладал среди БЛРС-продуцирующих 24 различных сиквенстипов *K. pneumoniae* в Японии [21]. Другие последовательности принадлежали варианту *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, кодирующему одну из наиболее часто встречающихся β-лактамаз в России CTX-M-14 (генетическая группа CTX-M-9) [22].

Факт наличия генов *bla*<sub>CTX-M-15</sub> у представителей разных видов семейства энтеробактерий свидетельствует о существовании реализуемого механизма межвидовой передачи генетической информации, что создает предпосылки для распространения механизмов формирования антибиотикорезистентных штаммов и увеличения количества устойчивых к АБ микроорганизмов.

### Заключение

Таким образом, установлено, что устойчивость *K. pneumoniae* и *A. baumannii* к АБ из группы карбапенемов обеспечена присутствием генов *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> и *bla*<sub>OXA-48</sub> соответственно. Генетические детерминанты *bla*<sub>CTX-M</sub> принадлежали к распространенным в России *bla*<sub>CTX-M-15</sub> и *bla*<sub>CTX-M-14</sub>. Штаммы, устойчивые к карбапенемам, выявлены в стационарах терапевтического профиля для лечения взрослого населения и не обнаружены в учреждении родовспоможения. Данный факт является благоприятным признаком и позволяет расценивать карбапенемы как эффективные препараты резерва в неонатологии. Тем не менее необходимо проводить мониторинг циркуляции граммотрицательных бактерий и выявлять механизмы резистентности к АБ данной группы с целью обнаружения при заносе в стационар и предотвращения внутрибольничного распространения БЛРС-продуцирующих штаммов среди пациентов перинатальных центров, которые характеризуются ограниченным спектром разрешенных к применению антибактериальных препаратов. Перспективным направлением дальней-

ших исследований является расширение спектра определяемых генетических детерминант, установление локализации генов и выявление других механизмов устойчивости к антибактериальным препаратам.

#### Информация о финансировании.

*Бюджетное финансирование.*

#### Financial support

*Budget financing.*

#### Конфликт интересов

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

#### Conflict of interests

*The authors declare that there is no conflict of interest.*

#### Литература

- Chandola P, Gupta RM, Lall M, Sen S, Shergill SPS, Dutta V. Molecular detection of *bla*<sub>NDM-1</sub> (New Delhi metallo-beta-lactamase-1) in nosocomial *Enterobacteriaceae* isolates by nested, multiplex polymerase chain reaction. *Med J Armed Forces India*. 2018 Apr;74(2):108-115. DOI: 10.1016/j.mjafi.2017.02.009
- Тапальский ДВ, Петровская ТА, Бонда НА, Козлова АИ, Осипкина ОВ. Распространенность карбапенемазопродуцирующих *Klebsiella pneumoniae* в Гомельской области. *Журнал микробиологии*. 2019;4:53-58.
- Pérez-Vázquez M, Sola Campoy PJ, Ortega A, Bautista V, Monzón S, Ruiz-Carrascoso G, et al. Emergence of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Spain: phylogeny, resistome, virulence and plasmids encoding *bla*<sub>NDM</sub>-like genes as determined by WGS. *J Antimicrob Chemother*. 2019 Dec 1;74(12):3489-3496. DOI: 10.1093/jac/dkz366
- Zhanel GG, Lawrence CK, Adam H, Schweizer F, Zelenitsky S, Zhanel M, et al. Imipenem-Relebactam and Meropenem-Vaborbactam: Two Novel Carbapenem-β-Lactamase Inhibitor Combinations. *Drugs*. 2018 Jan;78(1):65-98. DOI: 10.1007/s40265-017-0851-9
- Nithya N, Remitha R, Jayasree PR, Faisal M, Manish Kumar PR. Analysis of beta-lactamases, *bla*<sub>NDM-1</sub> phylogeny & plasmid replicons in multidrug-resistant *Klebsiella* spp. from a tertiary care centre in south India. *Indian J Med Res*. 2017 Jul;146(Supplement):S38-S45. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR\_31\_16
- Анганова ЕВ, Ветохина АВ, Распопина ЛА, Кичигина ЕЛ, Савилов ЕД. Состояние антибиотикорезистентности *Klebsiella pneumoniae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017;5:70-77. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-5-70-77
- Alcedo K, Ruiz J, Ochoa TJ, Riveros M. High Prevalence of *bla*<sub>CTX-M</sub> in Fecal Commensal *Escherichia coli* from Healthy Children *Infect Chemother*. 2022. Mar;54(1):59-69. DOI: 10.3947/ic.2021.0102
- Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo-β-lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiol*. 2017 Apr 27;17(1):101. DOI: 10.1186/s12866-017-1012-8
- Yuan Y, Li Y, Wang G, Li C, Chang YF, Chen W, et al. *bla*<sub>NDM-5</sub> carried by a hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* with sequence type 29 *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019 Aug 19;8:140. DOI: 10.1186/s13756-019-0596-1
- Li Y, Tang M, Dai X, Zhou Y, Zhang Z, Qiu Y, et al. Whole-Genomic Analysis of NDM-5-Producing *Enterobacteriaceae* Recovered from an Urban River in China. *Infect Drug Resist*. 2021 Oct 27;14:4427-4440. DOI: 10.2147/IDR.S330787
- Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom KA, Matsumura Y. The Global Ascendancy of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Nov 13;33(1):e00102-19. DOI: 10.1128/CMR.00102-19
- Тимофеева ОГ, Поликарпова СВ. Локальный микробиологический мониторинг штаммов *Enterobacteriales*, продуцирующих карбапенемазы. *Лабораторная служба*. 2019;8(3):14-19. DOI 10.17116/labs2019803114

- Баранцевич ЕП, Баранцевич НЕ, Шляхто ЕВ. Продукция карбапенемаз нозокомиальными штаммами *K. pneumoniae* в Санкт-Петербурге. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2016;18(3):196-199.
- Sun Y, Chen W, Wang S, Cao X. Co-occurrence of *fosA5*, *bla*<sub>SHV-145</sub> and *bla*<sub>OXA-48</sub> among a *Klebsiella pneumoniae* high-risk ST16 from a tertiary hospital in China: focusing on the phylogeny of OXA-48 genes from global *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Braz J Microbiol*. 2021 Dec;52(4):2559-2563. DOI: 10.1007/s42770-021-00572-6
- Starkova P, Lazareva I, Avdeeva A, Sulian O, Likholetova D, Ageevets V, et al. Emergence of Hybrid Resistance and Virulence Plasmids Harboring New Delhi Metallo-β-Lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Russia. *Antibiotics (Basel)*. 2021 Jun 9;10(6):691. DOI: 10.3390/antibiotics10060691
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977 Dec;74(12):5463-7. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463
- Сухорукова МВ, Эйдельштейн МВ, Иванчик НВ, Склеенова ЕЮ, Шайдуллина ЭР, Азизов ИС, и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriales* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН 2015–2016. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019;21(2):147-159. DOI 10.36488/стас.2019.2.147-159
- Zhang Z, Guo H, Li X, Li W, Yang G, Ni W, et al. Genetic Diversity and Characteristics of *bla*<sub>NDM</sub>-Positive Plasmids in *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2021 Nov 16;12:729952. DOI: 10.3389/fmicb.2021.729952
- Milic M, Siljic M, Cirkovic V, Jovicevic M, Perovic V, Markovic M, et al. Colonization with Multidrug-Resistant Bacteria in the First Week of Life among Hospitalized Preterm Neonates in Serbia: Risk Factors and Outcomes. *Microorganisms*. 2021 Dec 17;9(12):2613. DOI: 10.3390/microorganisms9122613
- Ogbolu DO, Alli OAT, Webber MA, Oluremi AS, Oloyede OM. CTX-M-15 is Established in Most Multidrug-Resistant Uropathogenic *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonaceae* from Hospitals in Nigeria. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2018 Mar 7;8(1):20-24. DOI: 10.1556/1886.2017.00012
- Kakuta N, Nakano R, Nakano A, Suzuki Y, Masui T, Horiuchi S, et al. Molecular characteristics of extended-spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Japan: Predominance of CTX-M-15 and emergence of hypervirulent clones. *Int J Infect Dis*. 2020 Sep;98:281-286. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.06.083
- Ильина ВН, Субботовская АИ, Козырева ВС, Сергеевичев ДС, Шилова АН. Характеристика штаммов *Enterobacteriaceae*, продуцирующих БЛРС CTX-M типа, выделенных в кардиохирургическом стационаре. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2013;15(4):309-314.

#### References

- Chandola P, Gupta RM, Lall M, Sen S, Shergill SPS, Dutta V. Molecular detection of *bla*<sub>NDM-1</sub> (New Delhi metallo-beta-lactamase-1) in nosocomial *Enterobacteriaceae* isolates by nested, multiplex polymerase chain reaction. *Med J Armed Forces India*. 2018 Apr;74(2):108-115. DOI: 10.1016/j.mjafi.2017.02.009
- Tapalski DV, Petrovskaya TA, Bonda NA, Kozlova AI, Osipkina OV. Prevalence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Gomel region. *Journal of Microbiology*. 2019;4:53-58. (In Russian).
- Pérez-Vázquez M, Sola Campoy PJ, Ortega A, Bautista V, Monzón S, Ruiz-Carrascoso G, et al. Emergence of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Spain: phylogeny, resistome, virulence and plasmids encoding *bla*<sub>NDM</sub>-like genes as determined by WGS. *J Antimicrob Chemother*. 2019 Dec 1;74(12):3489-3496. DOI: 10.1093/jac/dkz366
- Zhanel GG, Lawrence CK, Adam H, Schweizer F, Zelenitsky S, Zhanel M, et al. Imipenem-Relebactam and Meropenem-Vaborbactam: Two Novel Carbapenem-β-Lactamase Inhibitor Combinations. *Drugs*. 2018 Jan;78(1):65-98. DOI: 10.1007/s40265-017-0851-9

5. Nithya N, Remitha R, Jayasree PR, Faisal M, Manish Kumar PR. Analysis of beta-lactamases, *bla*<sub>NDM-1</sub> phylogeny & plasmid replicons in multidrug-resistant *Klebsiella* spp. from a tertiary care centre in south India. *Indian J Med Res.* 2017 Jul;146(Supplement):S38-S45. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR\_31\_16
6. Anganova EV, Vetokhina AV, Raspopina LA, Kichigina EL, Savilov ED. State of antibiotics resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2017;5:70-77. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-5-70-77 (In Russian).
7. Alcedo K, Ruiz J, Ochoa TJ, Riveros M. High Prevalence of *bla*<sub>CTX-M</sub> in Fecal Commensal *Escherichia coli* from Healthy Children Infect Chemother. 2022. Mar;54(1):59-69. DOI: 10.3947/ic.2021.0102
8. Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiol.* 2017 Apr 27;17(1):101. DOI: 10.1186/s12866-017-1012-8
9. Yuan Y, Li Y, Wang G, Li C, Chang YF, Chen W, et al. *bla*<sub>NDM-5</sub> carried by a hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* with sequence type 29 Antimicrob Resist Infect Control. 2019 Aug 19;8:140. DOI: 10.1186/s13756-019-0596-1
10. Li Y, Tang M, Dai X, Zhou Y, Zhang Z, Qiu Y, et al. Whole-Genomic Analysis of NDM-5-Producing *Enterobacteriaceae* Recovered from an Urban River in China. *Infect Drug Resist.* 2021 Oct 27;14:4427-4440. DOI: 10.2147/IDR.S330787
11. Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom KA, Matsumura Y. The Global Ascendency of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clin Microbiol Rev.* 2019 Nov 13;33(1):e00102-19. DOI: 10.1128/CMR.00102-19
12. Timofeeva OG, Polikarpova SV. Local microbiological monitoring of carbapenemases-producing *Enterobacteriales*. *Laboratory Service.* 2019;8(3):14-19. DOI 10.17116/labs2019803114 (In Russian).
13. Barantsevich EP, Barantsevich NE, Shlyakhto EV. Production of carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Saint-Petersburg. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2016;18(3):196-199. (In Russian).
14. Sun Y, Chen W, Wang S, Cao X. Co-occurrence of *fosA5*, *bla*<sub>SHV-145</sub> and *bla*<sub>OXA-48</sub> among a *Klebsiella pneumoniae* high-risk ST16 from a tertiary hospital in China: focusing on the phylogeny of OXA-48 genes from global *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Braz J Microbiol.* 2021 Dec;52(4):2559-2563. DOI: 10.1007/s42770-021-00572-6
15. Starkova P, Lazareva I, Avdeeva A, Sulian O, Likholetova D, Ageevets V, et al. Emergence of Hybrid Resistance and Virulence Plasmids Harboring New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Russia. *Antibiotics (Basel).* 2021 Jun 9;10(6):691. DOI: 10.3390/antibiotics10060691
16. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977 Dec;74(12):5463-7. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463
17. Sukhorukova MV, Edelstein MV, Ivanchik NV, Skleenova EYu, Shajdullina ER, Azyzov IS, et al. Antimicrobial resistance of nosocomial *Enterobacteriales* isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study "MARATHON 2015–2016". *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2019;21(2):147-159. DOI: 10.36488/cmasc.2019.2.147-159 (In Russian).
18. Zhang Z, Guo H, Li X, Li W, Yang G, Ni W, et al. Genetic Diversity and Characteristics of *bla*<sub>NDM</sub>-Positive Plasmids in *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2021 Nov 16;12:729952. DOI: 10.3389/fmicb.2021.729952
19. Milic M, Siljic M, Cirkovic V, Jovicevic M, Perovic V, Markovic M, et al. Colonization with Multidrug-Resistant Bacteria in the First Week of Life among Hospitalized Preterm Neonates in Serbia: Risk Factors and Outcomes. *Microorganisms.* 2021 Dec 17;9(12):2613. DOI: 10.3390/microorganisms9122613
20. Ogbolu DO, Alli OAT, Webber MA, Oluremi AS, Oloyede OM. CTX-M-15 is Established in Most Multidrug-Resistant Uropathogenic *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonaceae* from Hospitals in Nigeria. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* 2018 Mar 7;8(1):20-24. DOI: 10.1556/1886.2017.00012
21. Kakuta N, Nakano R, Nakano A, Suzuki Y, Masui T, Horiuchi S, et al. Molecular characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Japan: Predominance of CTX-M-15 and emergence of hypervirulent clones. *Int J Infect Dis.* 2020 Sep;98:281-286. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.06.083
22. Ilyina VN, Subbotovskaya AI, Kozyreva VS, Sergeevitchev DS, Shilova AN. Characteristics of *Enterobacteriaceae* strains producing CTX-M type ESBL in a cardiac surgery hospital. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2013;15(4):309-314. (In Russian).

---

#### Информация о соавторах:

Чистякова Гузель Нуховна, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации, руководитель научного отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ «Уральский НИИ охраны материнства и младенчества» Минздрава России

Ремизова Ирина Ивановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научного отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ «Уральский НИИ охраны материнства и младенчества» Минздрава России

Первушина Алёна Эрнестовна, врач-бактериолог ГБУЗ Свердловской области «Центральная городская больница №2 им. А.А.Миславского»

Шитова Алевтина Павловна, заведующая бактериологической лабораторией ГБУЗ Свердловской области «Центральная городская больница №2 им. А.А.Миславского»

Маханёк Анна Алексеевна, младший научный сотрудник ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Минздрава России

---

#### Information about co-authors:

Guzel N. Chistyakova, MD, PhD, DSc, Honored Scientist of the Russian Federation, Head of the Department of Immunology, Microbiology, Pathomorphology and Cytodiagnostics, Urals Scientific Research Institute for Maternal and Child Care

Irina I. Remizova, PhD, MD, Senior Researcher of the Department of Immunology, Microbiology, Pathomorphology and Cytodiagnostics, Urals Scientific Research Institute for Maternal and Child Care

Alena E. Pervushina, bacteriologist, A.A.Mislavsky Central City Hospital No 2

Alevtina P. Shitova, head of Bacteriological laboratory of the State Budgetary Institution of Health Care, A.A.Mislavsky Central City Hospital No 2

Anna A. Makhanyok, Junior Researcher, Urals Scientific Research Institute for Maternal and Child Care

# Современные аспекты генетической организации *Pseudomonas aeruginosa* как одного из возбудителей внебольничных и нозокомиальных пневмоний

А.А.Ковалевич, А.С.Водопьянов, Р.В.Писанов

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

Внебольничная пневмония остается в ряду наиболее актуальных болезней современного человека, занимая 4-е место в структуре причин смертности после сердечно-сосудистых, цереброваскулярных заболеваний и злокачественных новообразований.

**Целью исследования** являлось проведение анализа литературы по вопросу современного состояния генетической организации *Pseudomonas aeruginosa* как одного из возбудителей внебольничных и нозокомиальных пневмоний.

**Основная часть.** Актуальность внебольничной пневмонии в нашей стране во многом обусловлена существующими проблемами диагностики и лечения. Синегнойная палочка была определена как один из шести ведущих патогенов по смертности, связанной с устойчивостью к антибактериальным препаратам. Так, в 2019 г. во всем мире было зарегистрировано 334 000 случаев смерти людей с лекарственно-устойчивой инфекцией этого типа. Синегнойная палочка демонстрирует обширный набор как клеточно-ассоциированных, так и внеклеточных факторов вирулентности, которые определяют патогенез инфекции, контролируемый невероятно сложными системами, взаимосвязанными регуляторными цепями и сигнальными молекулами, придающими этому патогену большую пластичность и вариабельность.

**Заключение.** На данный момент в России преобладают микробиологические и биохимические методы идентификации синегнойной палочки. С учетом гибкости и изменчивости *P. aeruginosa* целесообразно активно применять современные методы молекулярно-генетического типирования. На сегодняшний день в этом может активно помогать технология полногеномного секвенирования. Использование новых способов идентификации будет способствовать эффективной дифференциации эпидемиологически значимых изолятов, а также выявлению новых факторов патогенности, вирулентности и устойчивости.

**Ключевые слова:** внебольничная пневмония, синегнойная палочка, *Pseudomonas aeruginosa*, геном, факторы вирулентности

**Для цитирования:** Ковалевич А.А., Водопьянов А.С., Писанов Р.В. Современные аспекты генетической организации *Pseudomonas aeruginosa* как одного из возбудителей внебольничных и нозокомиальных пневмоний. Бактериология. 2024; 9(1): 87–94. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-87-94

## Modern aspects of the genetic organization of *Pseudomonas aeruginosa* as one of the pathogens of community-acquired and nosocomial pneumonia

A.A.Kovalevich, A.S.Vodopyanov, R.V.Pisanov

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

**Introduction.** Community-acquired pneumonia (CAP) remains among the most urgent diseases of contemporary man, occupying the 4th place in the structure of causes of death after cardiovascular, cerebrovascular diseases and cancerous tumor. The aim of the study was to analyze the literature on the current state of the genetic organization of *Pseudomonas aeruginosa* as one of the pathogens of community-acquired and nosocomial pneumonia.

**The main part.** The relevance of CAP in our country is largely due to the existing problems of diagnosis and treatment. *P. aeruginosa* has been identified as one of the six leading pathogens in mortality associated with resistance to antibacterial drugs. So, in 2019, 334,000 deaths of people with drug-resistant infection of this type were registered worldwide. *P. aeruginosa* demonstrates an extensive set of both cell-associated and extracellular virulence factors that determine the pathogenesis of infection, controlled by incredibly complex systems, interconnected regulatory chains and signaling molecules that give this pathogen greater plasticity and variability.

### Для корреспонденции:

Ковалевич Алексей Александрович, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117  
Телефон: (863) 240-9133

Статья поступила 07.10.2023, принята к печати 29.03.2024

### For correspondence:

Alexey A. Kovalevich, Junior Researcher, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor

Address: 117 M.Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation  
Phone (863) 240-9133

The article was received 07.10.2023, accepted for publication 24.03.2024



**Conclusion.** Currently, microbiological and biochemical methods of identification of *P. aeruginosa* prevail in Russia. Taking in view the flexibility and variability of *P. aeruginosa*, it is advisable to actively apply modern methods of molecular genetic typing. At present, the technology of whole-genome sequencing can actively help in this. The use of new identification methods will facilitate the effective differentiation of epidemiologically significant isolates, as well as the identification of new factors of pathogenicity, virulence and resistance.

**Key words:** community-acquired pneumonia, *Pseudomonas aeruginosa*, genome, virulence factors

**For citation:** Kovalevich A.A., Vodopyanov A.S., Pisanov R.V. Modern aspects of the genetic organization of *Pseudomonas aeruginosa* as one of the pathogens of community-acquired and nosocomial pneumonia. Bacteriology. 2024; 9(1): 87–94. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-87-94

**В**небольничная пневмония (ВП) остается в ряду наиболее актуальных болезней современного человека, занимая 4-е место в структуре причин смертности после сердечно-сосудистых, цереброваскулярных заболеваний и злокачественных новообразований. Актуальность ВП в нашей стране во многом обусловлена существующими проблемами диагностики и лечения [1]. В России в 2015 г. регистрировались 3,9 случая на 1000 человек в год среди лиц старше 18 лет [2]. Среднемноголетняя заболеваемость ВП в период 2011–2019 гг. в РФ составляла 491,7/100000 (от 359,8/100000 среди взрослого трудоспособного населения и до 1505,4/100000 среди детей первых двух лет жизни). Наблюдается тенденция к росту заболеваемости, наиболее выраженная у детей школьного возраста (7–17 лет). Среди пневмоний с установленной этиологией (29,2% от всех пневмоний) преобладают бактериальные формы (94%, заболеваемость 142,5/100000) [3].

Выявление грамотрицательных бактерий в качестве этиологического агента ВП является значимым фактором риска летального исхода. Установлено, что наиболее частыми возбудителями ВП у пациентов, не отвечающих на стартовую антибактериальную терапию, являются представители родов *Acinetobacter*, *Klebsiella* и синегнойная палочка. Синегнойная палочка была определена как один из шести ведущих патогенов по смертности, связанной с устойчивостью к антибактериальным препаратам. Так, в 2019 г. во всем мире было зарегистрировано 334 000 случаев смерти людей с лекарственно-устойчивой инфекцией этого типа [4].

*Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка) – это грамотрицательная аэробная палочка из семейства *Pseudomonadaceae*, характеризуется высоким уровнем резистентности к антибактериальным препаратам, способностью образовывать биопленки, низкой проницаемостью внешней мембраны и наличием эффлюксных насосов [1, 5]. Входит в группу лидирующих микроорганизмов, включающую в себя шесть самых опасных бактерий-оппортунистов, объединенных термином ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp.) и представляющих опасность для населения различных стран [6].

Многочисленные факторы риска присоединения синегнойной инфекции могут быть классифицированы на несколько групп: эндогенные факторы и экзогенные. Эндогенные – связанные с состоянием пациента, характером медицинской технологии, факторами и особенностями послеоперационного периода. Экзогенные факторы определяются состоянием антиинфекционной защиты лечебно-диагностического процесса, состоянием больничной среды [7]. В совокупности это дает целый комплекс мероприятий, который

необходимо применять на каждом этапе для эффективного противодействия и ликвидации очага заражения.

Таким образом, существует потребность в изучении механизмов и факторов патогенности, которыми обладают штаммы *P. aeruginosa*, для более детального понимания биохимических и молекулярно-генетических механизмов выживания данного микроорганизма.

### Распространенность и экология *P. aeruginosa*

Синегнойная палочка распространена повсеместно и способна персистировать в разнообразных экологических ареалах, включая речные и морские бассейны, сточные воды, бутилированную воду, а также почвенные массивы [8–10].

*P. aeruginosa* считается представителем нормофлоры человека, выявляется на кожных покровах (до 2%), слизистой носа (до 3,3%), в ротоглотке (до 6,6%) и в желудочно-кишечном тракте (от 2,6 до 24%) [11]. Но в то же время она принадлежит к бактериям, которые в естественных условиях патогенны как для человека и животных, так и для растений [12–14].

Одной из проблем, которые стоят перед медиками, является распространенность синегнойной палочки в отделениях реанимации и интенсивной терапии, в которых этим возбудителем обусловлены примерно от 10 до 20% всех бактериальных инфекций, характеризующихся тяжелым течением и высокими показателями устойчивости к антибиотикам [15–17]. Тот факт, что клетки *P. aeruginosa* могут выживать в широком диапазоне температур, от +4°C до 42°C, делает ее актуальным возбудителем внутрибольничных инфекций практически по всей территории Российской Федерации, а также за рубежом. Это, в свою очередь, еще раз подчеркивает необходимость идентификации, типирования и дифференциации внутрибольничных штаммов от бактериальных представителей из экологических ареалов.

### Геном *P. aeruginosa*

В международной базе NCBI содержится информация о 6873 полных аннотированных геномах синегнойной палочки. Хромосомный геном *P. aeruginosa* содержит от 5,2 до 7 Mb (примерно 4000 генов). Полный набор генов у различных изолятов *P. aeruginosa* варьирует от 10 000 до 40 000, и, что интересно, их расположение в геноме может отличаться у разных штаммов, поэтому идентификация подходящих областей для генетических маркеров затруднена [18]. Учитывая вариабельность генома, неудивительно и то, что доля содержания регуляторных генов в нем одна из самых высоких среди всех бактериальных геномов (8,4%) [19]. Полногеномное секвенирование изолятов *P. aeruginosa*, полученных от пациентов с муковисцидозом, показало, что во время затяж-

ной инфекции микроорганизм подвергается адаптивным процессам, приводящим к накоплению мутаций [20]. В основном это точечные мутации (SNP), но также могут присутствовать и инсерции и даже крупные делеции, которые сохраняются в зависимости от того, насколько штамму, несущему эти мутации, удается быть конкурентноспособным, чтобы выжить в дыхательных путях пациентов [18]. Среди наиболее изменяемых генов, выявленных в изолятах от пациентов, можно отметить следующие группы генов: связанные с образованием биопленки (*vucA*, *algU*, *morA*), со снижением чувствительности к антибиотикам (*mexZ*, *nfxB*, *mexR*, *mpl*), со снижением выработки факторов вирулентности (*ykoM* и *mpl*) и различными регуляторными системами (*rpoN*, *nfxB*, *gacA*, *gacS*). [19]. Кроме того, исследования 361 изолята *P. aeruginosa* от пациентов выявили 1112 вариантов последовательностей, которые отсутствовали в геномах штаммов, выделенных из окружающей среды. Высокая частота полиморфизмов наблюдалась в генах *spuE*, *mexA*, *gyrA*, *rpoB*, *fusa1*, *mexZ*, *mexY*, *oprD*, *ampD*, *parR*, *parS* и *envZ*, которые, по-видимому, участвуют в защите бактерии от терапевтических препаратов. Интересно, что, по мнению ряда исследователей, относительные доли SNP были обнаружены в генах *fusA1A2*, *mexA*, *pagL*, которые кодируют белки, участвующие в трансляции, транспорте и модификации липополисахарида соответственно. Наряду с генами, участвующими в обновлении клеточной стенки (*ftsZ*, *murG*), гены *ampC* и *ftsI*, кодирующие β-лактамазу и пенициллинсвязывающий белок, также часто мутируют [20]. Данные исследования широко применяются за рубежом для выявления одиночных нуклеотидных полиморфизмов, что дает исследователям полное представление о природе изменчивости данного микроорганизма.

Помимо высокой адаптивной изменчивости у синегнойной палочки существуют интегративные и конъюгативные элементы – ICE [21]. Это модульные мобильные генетические элементы, которые могут интегрироваться в геном хозяина и распространяться посредством репликации клеток или подвергаться горизонтальному переносу после того, как они покинули хромосому [22]. ICE и плазмиды используют одну и ту же систему секреции IV типа для конъюгативного переноса. Разница между ICE и плазмидами заключается в их способности интегрироваться в хромосому [23]. Помимо этого, генетические элементы вовлечены в целый ряд механизмов, помогающих выжить микроорганизму: деградация ксенобиотических соединений, устойчивость к антибиотикам и формирование вирулентности [24, 25]. Несмотря на явную схожесть плазмиды и ICE элементов, частота их встречаемости гораздо выше, чем у плазмид. В совокупности это может позволить *P. aeruginosa* использовать новые ниши для выживания и повысить свою конкурентоспособность [26]. Также установлено что большинство геномов синегнойной палочки обладают активной системой CRISPR-Cas [26, 27]. Однако данный механизм имеет две стороны медали. С одной стороны, это дает преимущество, так как есть возможность получить в состав своего генома профаг или плазмиды, которые могут помочь процессу выживания и адаптации. С другой стороны, представители с активной функцией CRISPR-Cas ассоциированы с уменьшенным размером генома и менее активными процессами

горизонтального переноса генов. В свою очередь, это дает большие возможности для изучения взаимодействия систем CRISPR-Cas и семейства генов анти-CRISPR (Acr) [27]. Вопрос о применении бактериофагов для лечения синегнойных инфекций остается открытым. Весьма актуальной является разработка системы типирования внутрибольничных и экологических изолятов *P. aeruginosa* по CRISPR-Cas-системе.

### Факторы вирулентности *P. aeruginosa*

Синегнойная палочка демонстрирует обширный набор как клеточно-ассоциированных, так и внеклеточных факторов вирулентности, которые определяют патогенез инфекции, контролируемый невероятно сложными системами, взаимосвязанными регуляторными цепями и сигнальными молекулами, придающими этому патогену большую пластичность и вариабельность.

В данном обзоре мы постараемся более подробно рассмотреть структуру и функции важных факторов вирулентности при инфекциях, вызванных псевдомонадами, а именно: образование биопленок, системы кворум сенсинга (QS), сидерофоры пиовердин и пиохелин, липополисахарид (LPS) и белки внешней мембраны [28, 29].

Интересно отметить также, что на сегодняшний момент не опубликованы работы, направленные на изучение различий в наборе экзотоксинов у клинических культур и штаммов, которые могут присутствовать в качестве нормофлоры человека. Некоторые исследователи полагают, что штаммы *P. aeruginosa*, распространенные в экологических ареалах, генотипически и функционально эквивалентны клиническим [30]. Этот вопрос по-прежнему остается актуальным для изучения.

### Липополисахарид

LPS состоит из трех доменов: липида А, коровой области, О-антигена или О-полисахарида (OPS) [31]. Образуются различные гликоформы, которые способствуют его вирулентности. По структуре О-антигена выделяют более 20 серогрупп [32]. О-полисахарид представляет собой сильно изменчивую и иммуногенную периферическую длинную цепочку повторяющихся единиц, которая может быть как линейной, так и разветвленной [31]. Кроме того, одновременно продуцируются два О-антигена: общий полисахаридный антиген (CPA, или А-группа), гомополимер, имеющий консервативную структуру, состоящую из повторяющихся звеньев трисахарида d-рамнозы, и О-специфический антиген (OSA, или В-группа), гетерополимер, изменяемый штаммом, который дает начало 20 серотипам, согласно схеме, предложенной международной системой антигенного типирования (IATS) [33]. Поскольку OPS распространяется во внешнюю среду, он участвует во многих взаимодействиях типа хозяин–патоген: предотвращает уничтожение бактерий путем лизиса мембраны и фагоцитоза, защищает от окислительного стресса, стимулирует нетоз (NET) [34]. Однако клетки, которые не продуцируют CPA, не смогли образовывать устойчивые биопленки и продемонстрировали изменения в морфологии клеток и синтезе матрицы биопленки [35]. CPA также может быть важен для прикрепления бактерий к эпителиальным клеткам бронхов человека [32, 33, 36].

В Российской Федерации серотипирование синегнойной палочки не проводится ни молекулярными методами, ни серологическими. Поэтому вопрос о том, какие серогруппы могут циркулировать в лечебно-профилактических отделениях и в естественных экологических зонах на территории нашей страны, остается открытым и требует дальнейшего изучения.

### Образование биопленок

В образовании биопленок *P. aeruginosa* участвуют три экзополисахарида (EPSS): альгинат капсульного полисахарида и два агрегативных полисахарида (Psl и Pel). Они также содержат внеклеточную ДНК (eDNA) и белки. Биопленки характеризуются «закрытыми» грибовидными структурами и сложной сетью, которая распределяет питательные вещества и удаляет продукты жизнедеятельности микроорганизмов [37, 38]. К тому же развитие биопленки является многофакторным процессом. Инициация ее образования происходит с увеличением циклического димерного гуанозинмонофосфата (c-di-GMP), внутриклеточной сигнальной молекулы, которая индуцирует биосинтез адгезинов и факторов, необходимых для перехода от подвижного роста к прикреплению на поверхности и биопленкообразованию [39]. Наконец, малые РНК также регулируют образование биопленок [40]. Следует отметить, что недавнее исследование показало, что существует несколько путей развития биопленок и экспрессии генов, регулирующих реакции на стресс и адаптацию к среде с ограниченным содержанием кислорода и железа, жизненно важных для этого процесса [41].

Образование биопленок – это большая проблема для современной медицины. Невозможно представить современную больницу без применения таких материалов, как силиконы и пластики, которые используются во многих жизненно важных приборах – от катетеров до трубок искусственной вентиляции легких. Однако эти материалы таят в себе опасность, являясь хорошим субстратом для формирования биопленки синегнойной палочки и дальнейшего инфицирования пациента. В этом процессе участвуют также и другие факторы, в частности, кворум сенсинг и пили адгезии.

### Кворум сенсинг

Кворум имеет большое значение для регуляции генов, обеспечивая межклеточную коммуникацию и адаптацию к изменениям окружающей среды [42]. *P. aeruginosa* имеет четыре взаимосвязанных системы кворум сенсинга (Las, Iqs, Rhl, Pqs). Система Las является основным регулятором сигналов, положительно контролируя экспрессию трех других систем. Аналогичным образом, система Iqs оказывает стимулирующее воздействие на Pqs и Rhl системы, тогда как Rhl отрицательно регулирует Pqs [42–44]. Подобная сеть молекулярных сигналов обладает высокой адаптивностью и способностью реагировать на внешние стрессовые факторы, обеспечивая исключительную адаптационную гибкость *P. aeruginosa* [42]. Подробнее можно остановиться на каждом из них. LasR и Rhl представляют собой наиболее доминирующие регуляторные паттерны. Система Las также подавляет выработку экзополисахарида Pel [45] и индуцирует апоптоз в эпителиальных клетках дыхательных путей [46, 47]. В системе Las LASI является синтазой аутоиндуктора,

которая опосредует синтез N-3-оксододеканойл-L-гомосерин лактона (C12HSL). C12HSL также помогает выживанию бактерий, вызывая гибель иммунных клеток хозяина [48]. Она регулирует выработку лектина A (LecA), влияющего на формирование биопленки [49]. Как и система Las, система Pqs создает петлю положительной обратной связи, связывающуюся с промотором оперона *pqsABCDE*, что приводит к выработке белка PqsE, основного эффектора вирулентности системы хинолонов [50]. Кроме того, PqsE положительно регулирует экспрессию генов, связанных с захватом железа, эффлюксными насосами, участвующими в биосинтезе цианистого водорода, эластазы и внеклеточной хитиназы [51]. Вдобавок к этому система Pqs опосредует высвобождение eDNA, что необходимо для создания стабильных и зрелых биопленок [49]. Помимо того, что PQS (2-гептил-3-гидрокси-4-хинолон, называемый хинолоновым сигналом *P. aeruginosa*) является сигнальной молекулой кворум сенсинга, он также действует как посредник в усвоении железа, подавляет секрецию рецепторов интерлейкина-2 (IL-2) и IL-12; стимулирует хемотаксис нейтрофилов, выработку АФК и фактора некроза опухоли- $\alpha$  [50].

Система Iqs была открыта совсем недавно и использует новый тип сигнальной молекулы: 2-(2-гидроксифенил)-триазол-4-карбальдегид (IQS). На сегодняшний день его родственный рецептор неизвестен [52]. Эта система может частично контролировать функции системы Las и при ее нарушении снижает выработку пиоцианина, рамнолипидов и эластаз [52]. Кроме того, IQS ингибирует рост клеток-хозяев и стимулирует апоптоз, нарушая репарацию поврежденной ДНК [53].

### Системы захвата и утилизации железа

Чтобы удовлетворить потребность в железе *P. aeruginosa* использует различные стратегии: производство низкомолекулярных органических соединений, называемых сидерофорами (пиовердин и пиохелин), поглощение ксеносидерофоров, поглощение молекул гема из гемопротеинов хозяина через две системы (Has и Phu), восстановление железа фенозаминами через систему Feo [54, 55]. Основным сидерофором является пиовердин, состоящий из переменной пептидной цепи и консервативного хромофора дигидроксихинолина, который связывает железо. Его можно разделить на три типа в зависимости от структуры пептидной цепи: PVDI, PVDII и PVDIII [55]. Ген *pvd* может выступать как индуктором эндопротеиназы (PRPL), так и опосредованно синтезируя пиовердин участвовать в реакциях Фентона, что приводит к образованию высоких концентраций свободных радикалов, которые могут повреждать клетки хозяина. Также пиохелин может вызывать окислительный стресс и воспалительные процессы, особенно в присутствии пиоцианина [54].

Из анализа литературы о системах поглощения *P. aeruginosa* железа следует, что эта бактерия может хорошо адаптировать свою стратегию захвата железа в зависимости от вызываемой инфекции. При моноинфекциях, обусловленных *P. aeruginosa*, бактерии используют свой высокоаффинный пиовердиновый сидерофор, который в то же время действует как сигнальная молекула для выработки факторов вирулентности (протеазы PrpL и экзотоксин A). У синегнойной палочки имеется более 30 генов, кодирующих TBDRs,

большинство из которых участвуют в поглощении сидерофоров [54, 56]. Эти системы могут иметь важное значение в случае полимикробных инфекций, при которых *P. aeruginosa* может иметь преимущество из-за своей способности «красть» сидерофоры, продуцируемые другими микроорганизмами (сидерофорное пиратство), лишая конкурентов железа [57].

С одной стороны, закрепляясь в нише, где микроорганизм может выживать и вызывать воспалительный процесс, он демонстрирует тенденцию к потере способности продуцировать пиовердин. С другой стороны, он может полагаться на альтернативные стратегии поглощения железа, такие как поглощение гема из гемопротеинов и поглощение  $Fe^{2+}$ , который образуется за счет окислительно-восстановительной активности феназинов [58, 59]. Безусловно, этот вопрос важен с точки зрения определения степени вирулентности *P. aeruginosa*, а также поиска методов типирования на их основе.

### Антибиотикорезистентность

Что же касается устойчивости к антибиотикам, *P. aeruginosa* характеризуется наличием механизмов природной устойчивости к целому ряду препаратов, включая аминопенициллины, тетрациклины/глицилциклины, эртапенемы и большинство цефалоспоринов. Кроме того, важной особенностью данного микроорганизма является быстрое формирование устойчивости ко многим другим антибактериальным препаратам [60].

*P. aeruginosa* характеризуется высокой избирательностью веществ, проникающих через мембрану, благодаря ограниченному числу крупных трансмембранных каналов. В основном эту функцию выполняют порины OprF (большинство каналов OprF очень малы) и небольшого размера каналы других поринов OprD и OprB, которые связаны с прохождением молекул, таких как антибиотики. В то же время существуют и другие механизмы, такие как: эффлюкс-зависимое удаление антибиотика из периплазматического пространства [61], транспортеры семейства RND (Resistance-Nodulation-Cell Division), MexAB-OprM и MexXY-OprM, синтез  $\beta$ -лактамазы AmpC [62]. Серьезную озабоченность вызывает распространение плазмид-опосредованных  $\beta$ -лактамаз расширенного спектра действия (ESBLs), которые первоначально были описаны у *Enterobacteriaceae*, и металло- $\beta$ -лактамаз (MBLS), которые инактивируют карбапенемы [63, 64]. Данные механизмы уменьшают поступление или полностью выводят антибиотик через внешнюю мембрану.

В свою очередь мутации, приводящие к сверхэкспрессии эффлюксных насосов, приводят к снижению поглощения антибиотиков и изменению антибиотических мишеней. Например, важным механизмом устойчивости являются мутации в насосах MexAB-OprM и MexCD-OprJ, которые регулируются системами mexR и nfxB соответственно [65]. Благодаря этому бактериальные клетки, которые не обладают устойчивостью, могут выживать, взаимодействуя друг с другом в популяции с использованием кворум сенсинга. Вследствие этого вырабатывается антибиотикорезистентность, опосредованная сверхэкспрессией MexCD-OprJ, что позволяет функционировать этим неустойчивым клеткам под маской устойчивых в смешанных популяциях, колонизи-

рующих легкие пациента. Эта особенность может иметь важные последствия для сохранения устойчивых к антибиотикам бактерий даже при отсутствии естественного отбора [66, 67].

Важный компонент резистентности синегнойной палочки – везикулы наружной мембраны. Они образуются путем выпячивания наружной мембраны и обогащены различными биомолекулами. Установлено, что везикулы наружной мембраны играют ключевую роль в межклеточной коммуникации, устойчивости к антибиотикам, структуре биопленки и доставке молекул и веществ внутри бактериального сообщества, даже таких, как токсины и факторы вирулентности [68]. Генезис везикул неразрывно связан со структурой ЛПС мембраны микроорганизма. Основным фактором, способствующим биогенезу везикул наружной мембраны у *P. aeruginosa*, является выработка хинолонового сигнала псевдомонад (PQS). PQS является одной из молекул сложной схемы определения кворум сенсинга, которая может регулировать групповое поведение *P. aeruginosa*. Высокогидрофобный PQS экспортируется в везикулы наружной мембраны, экскретируется в ней путем взаимодействия с ацильными цепями липида А и фосфатами, что вызывает модификацию мембраны и тем самым делает клетку «незаметной» для антибиотика [69, 70].

### Заключение

В настоящее время условно-патогенные микроорганизмы, обладающие мультирезистентностью к различным видам антибактериальных агентов, являются актуальной проблемой эпидемиологии и здравоохранения. К этим микроорганизмам относится и *P. aeruginosa*. В 2017 г. Всемирная организация здравоохранения заявила, что карбапенемрезистентные штаммы *P. aeruginosa* занимают второе место в приоритетном листе патогенов, требующих разработки новых антимикробных препаратов [71]. Поиск новых способов противодействия данному микроорганизму является важной задачей, и он невозможен без глубокого изучения структурной организации генома, факторов персистенции и патогенности новых изменчивых клинических изолятов, формирующихся благодаря широкой горизонтальной передаче генетического материала. Учитывая пластичность и изменчивость рассматриваемой бактерии, необходимо широко внедрять методики молекулярно-генетического маркирования, типирования на основе данных полногеномного секвенирования с целью разделения экологических и клинически значимых изолятов, выявления новых факторов патогенности и полиантибиотикорезистентности.

### Информация о финансировании

При проведении исследования внешнее финансирование отсутствовало.

### Financial support

The authors state that there is no external funding for the study.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

## Литература/References

1. Сусалина АГ. Респираторная медицина. Руководство: в 3 т. М.: Литтерра, 2017;2:29-74. / Susalina AG. Respiratornaya meditsina. Rukovodstvo: v 3 t. M.: Litterra Publ., 2017;2:29-74. (In Russian).
2. Чучалин АГ. Пневмония: актуальная проблема медицины XXI века. Пульмонология. 2015;25(2):133-142. / Chuchalin AG. Pnevmoniya: aktual'naya problema meditsiny XXI veka. Pulmonologiya. 2015;25(2):133-142. (In Russian).
3. Брико НИ, Коршунов ВА, Ломоносов КС. Пневмококковая инфекция в Российской Федерации: состояние проблемы. Вестник РАМН. 2021;76(1):28-42. / Briko NI, Korshunov VA, Lomonosov KS. Pneumococcal Infection in Russia: State of the Issue. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2021;76(1):28-42. DOI: 10.15690/vramn1404 (In Russian).
4. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. Lancet. 2022 Feb 12;399(10325):629-655. Erratum in: Lancet. 2022 Oct 1;400(10358):1102. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0
5. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin Microbiol Rev. 2009 Oct;22(4):582-610. DOI: 10.1128/CMR.00040-09
6. Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. J Infect Dis. 2008 Apr 15;197(8):1079-81. DOI: 10.1086/533452
7. Егорова ОН. Эпидемиология и профилактика синегнойной инфекции. Федеральные клинические рекомендации. М.: Мин. здравоохранения РФ, 2014. / Egorova ON. Epidemiologiya i profilaktika sinegnoinoi infektsii. Federal'nye klinicheskie rekomendatsii. M.: Min. zdravoohraneniya RF, 2014. (In Russian).
8. Morrison AJ Jr, Wenzel RP. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Infect Dis. 1984 Sep-Oct;6 Suppl 3:S627-42. DOI: 10.1093/clinids/6.supplement\_3.s627
9. Starkey M, Rahme LG. Modeling *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis in plant hosts. Nat Protoc. 2009;4(2):117-24. DOI: 10.1038/nprot.2008.224
10. Коробейко ЕС, Наказная ЕН, Овечкина ИГ. Распространение клебсиелл и синегнойных палочек в водной среде и их значение в возникновении острых кишечных инфекций при водопользовании. Актуальные проблемы и методические подходы к диагностике, лечению и профилактике болезней животных. 2019;143-148. / Korobeiko ES, Nakaznaya EN, Ovechkina IG. Distribution of bacteria of the klebsiella strain in water objects and their value in developing of the water caused acute intestinal infections. Aktualnye problemy i metodicheskie podkhody k diagnostike, lecheniyu i profilaktike boleznei zhivotnykh. 2019;143-148. (In Russian).
11. Кузнецова МВ. Распространенность возбудителя и разнообразие нозологических форм синегнойной инфекции (обзор). Здоровье семьи – XXI век. 2014(2):84-112. / Kuznetsova MV. Rasprostranennost' vzbudatelya i raznoobrazie nozologicheskikh form sinegnoinoi infektsii (obzor). Zdorov'e sem'i – XXI vek. 2014(2):84-112. (In Russian).
12. Fatima A, Naqvi SB, Khaliq SA, Perveen S, Jabeen S. Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients of lower respiratory tract infections. Springerplus. 2012 Dec;1(1):70. DOI: 10.1186/2193-1801-1-70
13. Chahtane H, Nogueira Füller T, Allard PM, Marcourt L, Ferreira Queiroz E, Shanmugabalaji V, et al. The plant pathogen *Pseudomonas aeruginosa* triggers a DELLA-dependent seed germination arrest in Arabidopsis. Elife. 2018 Aug 28;7:e37082. DOI: 10.7554/eLife.37082
14. Новгородова АЮ. Экологические аспекты бактерий рода *Pseudomonas* на территории Украины. Сельскохозяйственные науки и агропромышленный комплекс на рубеже веков. 2014;5:248-251. / Novgorodova AYU. Ekologicheskie aspekty bakterii roda *Pseudomonas* na territorii Ukrainy. Sel'skokhozyaistvennyye nauki i agropromyshlennyy kompleks na rubezhe vekov. 2014(5):248-251. (In Russian).
15. Custovic A, Smajlovic J, Hadzic S, Ahmetagic S, Tihic N, Hadzagic H. Epidemiological surveillance of bacterial nosocomial infections in the surgical intensive care unit. Mater Sociomed. 2014 Feb;26(1):7-11. DOI: 10.5455/msm.2014.26.7-11
16. Agodi A, Barchitta M, Auxilia F, Brusafiero S, D'Errico MM, Montagna MT, et al; Collaborators. Epidemiology of intensive care unit-acquired sepsis in Italy: results of the SPIN-UTI network. Ann Ig. 2018 Sep-Oct;30(5 Suppl 2):15-21. DOI: 10.7416/ai.2018.2247
17. Pachori P, Gothwal R, Gandhi P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. Genes Dis. 2019 Apr 17;6(2):109-119. DOI: 10.1016/j.gendis.2019.04.001
18. Mielko KA, Jabłoński SJ, Milczewska J, Sands D, Łukaszewicz M, Młynarz P. Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. World J Microbiol Biotechnol. 2019 Nov 7;35(11):178. DOI: 10.1007/s11274-019-2739-1
19. Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Mol Biol Rev. 2010 Dec;74(4):621-41. DOI: 10.1128/MMBR.00027-10
20. Jurado-Martin I, Sainz-Mejias M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. Int J Mol Sci. 2021 Mar 18;22(6):3128. DOI: 10.3390/ijms22063128
21. Johnson CM, Grossman AD. Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. Annu Rev Genet. 2015;49:577-601. DOI: 10.1146/annurev-genet-112414-055018
22. Chen F, Wang P, Yin Z, Yang H, Hu L, Yu T, et al. VIM-encoding IncpSTY plasmids and chromosome-borne integrative and mobilizable elements (IMEs) and integrative and conjugative elements (ICEs) in *Pseudomonas*. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2022 Mar 9;21(1):10. DOI: 10.1186/s12941-022-00502-w
23. Carter MQ, Chen J, Lory S. The *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity island PAPI-1 is transferred via a novel type IV pilus. J Bacteriol. 2010 Jul;192(13):3249-58. DOI: 10.1128/JB.00041-10
24. Chang W, Small DA, Toghrol F, Bentley WE. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* reveals induction of pyocin genes in response to hydrogen peroxide. BMC Genomics. 2005 Sep 8;6:115. DOI: 10.1186/1471-2164-6-115
25. Chibeu A, Ceysens PJ, Hertveldt K, Volckaert G, Cornelis P, Matthijs S, et al. The adsorption of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage phiKMV is dependent on expression regulation of type IV pili genes. FEMS Microbiol Lett. 2009 Jun;296(2):210-8. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01640.x
26. Wheatley RM, MacLean RC. CRISPR-Cas systems restrict horizontal gene transfer in *Pseudomonas aeruginosa*. ISME J. 2021 May;15(5):1420-1433. DOI: 10.1038/s41396-020-00860-3
27. León LM, Park AE, Borges AL, Zhang JY, Bondy-Denomy J. Mobile element warfare via CRISPR and anti-CRISPR in *Pseudomonas aeruginosa*. Nucleic Acids Res. 2021 Feb 26;49(4):2114-2125. DOI: 10.1093/nar/gkab006
28. Balasubramanian D, Schneper L, Kumari H, Mathee K. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. Nucleic Acids Res. 2013 Jan 7;41(1):1-20. DOI: 10.1093/nar/gks1039
29. Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Mol Biol Rev. 2012 Mar;76(1):46-65. DOI: 10.1128/MMBR.05007-11
30. Streeter K, Katouli M. *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. 2016.
31. Maldonado RF, Sá-Correia I, Valvano MA. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. FEMS Microbiol Rev. 2016 Jul;40(4):480-93. DOI: 10.1093/femsre/fuw007
32. Huszczyński SM, Lam JS, Khursigara CM. The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology. Pathogens. 2019 Dec 19;9(1):6. DOI: 10.3390/pathogens9010006

33. Lam JS, Taylor VL, Islam ST, Hao Y, Kocincová D. Genetic and Functional Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide. *Front Microbiol.* 2011 Jun 1;2:118. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00118
34. Pieterse E, Rother N, Yanginlar C, Hilbrands LB, van der Vlag J. Neutrophils Discriminate between Lipopolysaccharides of Different Bacterial Sources and Selectively Release Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol.* 2016 Nov 4;7:484. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00484
35. Murphy K, Park AJ, Hao Y, Brewer D, Lam JS, Khursigara CM. Influence of O polysaccharides on biofilm development and outer membrane vesicle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol.* 2014 Apr;196(7):1306-17. DOI: 10.1128/JB.01463-13
36. Lam JS, Taylor VL, Islam ST, Hao Y, Kocincová D. Genetic and Functional Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide. *Front Microbiol.* 2011 Jun 1;2:118. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00118
37. Yan S, Wu G. Can Biofilm Be Reversed Through Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*? *Front Microbiol.* 2019 Jul 23;10:1582. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01582
38. Mann EE, Wozniak DJ. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 Jul;36(4):893-916. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x
39. Wei Q, Ma LZ. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci.* 2013 Oct 18;14(10):20983-1005. DOI: 10.3390/ijms141020983
40. Miller CL, Romero M, Karna SL, Chen T, Heeb S, Leung KP, RsmW, *Pseudomonas aeruginosa* small non-coding RsmA-binding RNA upregulated in biofilm versus planktonic growth conditions. *BMC Microbiol.* 2016 Jul 19;16(1):155. DOI: 10.1186/s12866-016-0771-y
41. Thöming JG, Tomasch J, Preusse M, Koska M, Grahl N, Pohl S, et al. Parallel evolutionary paths to produce more than one *Pseudomonas aeruginosa* biofilm phenotype. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2020 Jan 10;6:2. DOI: 10.1038/s41522-019-0113-6
42. Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell.* 2015 Jan;6(1):26-41. DOI: 10.1007/s13238-014-0100-x
43. Wade DS, Calfee MW, Rocha ER, Ling EA, Engstrom E, Coleman JP, et al. Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2005 Jul;187(13):4372-80. DOI: 10.1128/JB.187.13.4372-4380.2005
44. Alfinyah C, Bees MA, Wood AJ. Quorum machinery: Effect of the las system in rhl regulation of *P. aeruginosa*. *AIP Conference Proceedings.* AIP Publishing LLC. 2019;2192(1).
45. Ueda A, Wood TK. Connecting quorum sensing, c-di-GMP, pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885). *PLoS Pathog.* 2009 Jun;5(6):e1000483. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000483
46. Schwarzer C, Ravishankar B, Patanwala M, Shuai S, Fu Z, Illek B, et al. Thapsigargin blocks *Pseudomonas aeruginosa* homoserine lactone-induced apoptosis in airway epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2014 May 1;306(9):C844-55. DOI: 10.1152/ajpcell.00002.2014
47. Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 18;22(6):3128. DOI: 10.3390/ijms22063128
48. Song D, Meng J, Cheng J, Fan Z, Chen P, Ruan H, et al. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing metabolite induces host immune cell death through cell surface lipid domain dissolution. *Nat Microbiol.* 2019 Jan;4(1):97-111. DOI: 10.1038/s41564-018-0290-8
49. Lin J, Cheng J. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* and its relationship to biofilm development. *Introduction to Biofilm Engineering.* American Chemical Society. 2019;1-16.
50. Lin J, Cheng J, Wang Y, Shen X. The *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS): Not Just for Quorum Sensing Anymore. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018 Jul 4;8:230. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00230
51. García-Reyes S, Soberón-Chávez G, Cocotl-Yanez M. The third quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: *Pseudomonas* quinolone signal and the enigmatic PqsE protein. *J Med Microbiol.* 2020 Jan;69(1):25-34. DOI: 10.1099/jmm.0.001116
52. Cornelis P. Putting an end to the *Pseudomonas aeruginosa* IQS controversy. *Microbiologyopen.* 2020 Feb;9(2):e962. DOI: 10.1002/mbo3.962
53. Lee J, Wu J, Deng Y, Wang J, Wang C, Wang J, et al. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nat Chem Biol.* 2013 May;9(5):339-43. Erratum in: *Nat Chem Biol.* 2013 Jun;9(6):406. DOI: 10.1038/nchembio.1225
54. Cornelis P, Dingemans J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013 Nov 14;3:75. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00075
55. Dauner M, Skerra A. Scavenging Bacterial Siderophores with Engineered Lipocalin Proteins as an Alternative Antimicrobial Strategy. *Chembiochem.* 2020 Mar 2;21(5):601-606. DOI: 10.1002/cbic.201900564
56. Rezzoagli C, Wilson D, Weigert M, Wyder S, Kümmerli R. Probing the evolutionary robustness of two repurposed drugs targeting iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Evol Med Public Health.* 2018 Sep 10;2018(1):246-259. DOI: 10.1093/emph/eoy026
57. Traxler MF, Seyedsayamdost MR, Clardy J, Kolter R. Interspecies modulation of bacterial development through iron competition and siderophore piracy. *Mol Microbiol.* 2012 Nov;86(3):628-44. DOI: 10.1111/mmi.12008
58. Hunter RC, Asfour F, Dingemans J, Osuna BL, Samad T, Malfroot A, et al. Ferrous iron is a significant component of bioavailable iron in cystic fibrosis airways. *mBio.* 2013 Aug 20;4(4):e00557-13. DOI: 10.1128/mBio.00557-13
59. Schalk IJ, Cunrath O. An overview of the biological metal uptake pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol.* 2016 Oct;18(10):3227-3246. DOI: 10.1111/1462-2920.13525
60. Склеенова ЕЮ, Азизов ИС, Шек ЕА, Эйдельштейн МВ, Козлов РС, Дехнич АВ. *Pseudomonas aeruginosa* в РФ: история одного из наиболее успешных нозокомиальных патогенов. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2018;20(3):164-171. / Skleenova EYu, Azizov IS, Shek EA, Eidelshstein MV, Kozlov RS, Dekhnic AV. *Pseudomonas aeruginosa*: the history of one of the most successful nosocomial pathogens in Russian hospitals. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2018;20(3):164-171. (In Russian).
61. Li XZ, Zhang L, Poole K. Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2000 Apr;45(4):433-6. DOI: 10.1093/jac/45.4.433
62. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jan;22(1):161-82. Table of Contents. DOI: 10.1128/CMR.00036-08
63. Bush K. Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Crit Care.* 2010;14(3):224. DOI: 10.1186/cc8892
64. Chairat S, Ben Yahia H, Rojo-Bezares B, Sáenz Y, Torres C, Ben Slama K. High prevalence of imipenem-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Burns Hospital in Tunisia: detection of a novel class 1 integron. *J Chemother.* 2019 May;31(3):120-126. DOI: 10.1080/1120009X.2019.1582168
65. Suresh M. Mutational and Phylogenetic Analysis of nfxB Gene in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Hyperexpressing MexCD-OprJ Efflux Pump. *Advances in Microbiology.* 2019;9(12).
66. Alcalde-Rico M, Olivares-Pacheco J, Alvarez-Ortega C, Cámara M, Martínez JL. Role of the Multidrug Resistance Efflux Pump MexCD-OprJ in the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Response. *Front Microbiol.* 2018 Nov 23;9:2752. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02752
67. Knöppel A, Näsval J, Andersson DI. Evolution of Antibiotic Resistance without Antibiotic Exposure. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Oct 24;61(11):e01495-17. DOI: 10.1128/AAC.01495-17

68. Schwechheimer C, Kuehn MJ. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol*. 2015 Oct;13(10):605-19. DOI: 10.1038/nrmicro3525
69. Schertzer JW, Whiteley M. A bilayer-couple model of bacterial outer membrane vesicle biogenesis. *mBio*. 2012 Mar 13;3(2):e00297-11. DOI: 10.1128/mBio.00297-11
70. Li A, Schertzer JW, Yong X. Molecular conformation affects the interaction of the *Pseudomonas* quinolone signal with the bacterial outer membrane. *J Biol Chem*. 2019 Jan 25;294(4):1089-1094. DOI: 10.1074/jbc.AC118.006844
71. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al; WHO Pathogens Priority List Working Group. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018 Mar;18(3):318-327. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3

#### Информация о соавторах:

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

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

#### Information about co-authors:

Alexey S. Vodopyanov, PhD, MD, Leading Researcher, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosptrebnadzor

Ruslan V. Pisanov, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosptrebnadzor

## НОВОСТИ НАУКИ

### Гены устойчивости к антибиотикам распространены между бактериями более широко, чем считалось ранее

Глобальное распространение плазмидной устойчивости к карбапенемам является постоянной проблемой общественного здравоохранения; однако природа таких событий горизонтального переноса генов среди сложных бактериальных сообществ остается плохо изученной.

Ученые исследовали перенос *in-situ* глобально доминирующей металло-β-лактамазы Нью-Дели (NDM)-5-положительной плазмиды IncX3 (обозначенной рХ3\_NDM-5) в сточных водах больницы, чтобы смоделировать реальный контекст устойчивости к противомикробным препаратам One Health.

Для исследования передачи поместили рХ3\_NDM-5 геном зеленого флуоресцентного белка *gfp*, используя метод на основе CRISPR, и перенесли плазмиду донорскому штамму *Escherichia coli*. Бактерии были извлечены из больницы станции очистки сточных вод (Провинциальная родильная и детская больница провинции Фуцзянь, Фучжоу, Китай) в качестве бактериального сообщества-реципиента. Сообщество реципиентов смешали с донорским штаммом *E. coli*, несущим плазмиду, меченную *gfp*, как с гипохлоритом натрия (NaClO), так и без него в качестве стрессора окружающей среды, и провели несколько культуральных и независимых от культуры анализов конъюгации. События конъюгации наблюдали микроскопически и количественно определяли путем сортировки клеток, активируемой флуоресценцией. Проанализировали таксономический состав отсортированного трансконоъюгантного пула методом секвенирования ампликона гена 16S рPHK и оценили стабильность плазмиды в выделенных трансконоъюгантах и ее способность переносить обратно в *E. coli*.

Показано, что плаزمида рХ3\_NDM-5 имеет широкий круг хозяев и может передаваться между различными типами бактерий, в том числе между грамотрицательными и грамположительными бактериями. Хотя экологический стресс NaClO не влиял на общую частоту переноса плазмиды, он уменьшал ширину пула трансконоъюгантов. Таксономический состав трансконоъюгантного пула отличался от такового в сообществах-реципиентах, а стресс окружающей среды модулировал способность некоторых операционных таксономических единиц к приобретению рХ3\_NDM-5. Примечательно, что трансконоъюганты рХ3\_NDM-5 включали грамположительный патоген *Enterococcus faecalis*, и плазмиду впоследствии можно было реконъюгировать обратно в *E. coli*. Эти данные позволяют предположить, что *E. faecalis* может действовать как естественный челночный вектор для широкого распространения плазмид рХ3\_NDM-5.

Данные показывают, что плазмиды распространяются более широко по родам и типам, чем считалось ранее. Эти результаты имеют существенное значение при рассмотрении распространения устойчивости к противомикробным препаратам в секторах One Health.

Yang QE, Ma X, Zeng L, Wang Q, Li M, Teng L, et al.  
*Interphylum dissemination of NDM-5-positive plasmids in hospital wastewater from Fuzhou, China: a single-centre, culture-independent, plasmid transmission study.*  
*Lancet Microbe*. 2023 Nov 22:S2666-5247(23)00227-6. DOI: 10.1016/S2666-5247(23)00227-6

# Генетическая стабильность бактериальных культур в процессе хранения

А.Ю.Лебедева, А.Е.Соломенцева, М.Р.Барькова, Н.А.Сухаричева

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

Бактериальные культуры нашли широкое применение в медицинской, пищевой и биотехнологической отраслях. Хранение штаммов и изучение их свойств является одной из важнейших задач коллекций культур. Для поддержания культур в жизнеспособном состоянии могут использоваться различные методические приемы – пересевы на плотные и жидкие питательные среды, лиофильное высушивание, криоконсервация. Однако переход к условиям длительного хранения является сильным стрессовым фактором для большинства микроорганизмов. Это способствует повышению частоты мутационного процесса и приводит к изменению их генотипических и фенотипических свойств. В настоящем обзоре рассматриваются основные методы хранения и стрессовые факторы, влияющие на возникновение мутаций.  
**Ключевые слова:** лиофилизация, криоконсервация, хранение микроорганизмов, мутационный процесс, фенотип, генотип

**Для цитирования:** Лебедева А.Ю., Соломенцева А.Е., Барькова М.Р., Сухаричева Н.А. Генетическая стабильность бактериальных культур в процессе хранения. Бактериология. 2024; 9(1): 95–104. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-95-104

## Genetic stability of microbial cultures in preservation

A.Yu.Lebedeva, A.E.Solomentseva, M.R.Barkova, N.A.Sukharicheva

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

The activity of microbial collections is related to the study and maintenance of bacterial cultures used in the medical, food and biotechnology industries. To maintain cultures in a viable state, various methodological techniques can be used – transfers on solid and liquid nutrient media, freeze-drying, cryopreservation. However, the transition to long-term storage conditions is a strong stress factor for most microorganisms, and, as a result, it contributes to an increase in the frequency of mutations. There are a number of problems of long-term preservation of microorganisms, including loss of viability of strains, as well as changes in their phenotype and genotype. In this review we are mostly focused on the main stress factors that affect the occurrence of mutations during long-term preservation of microorganism strains using various storage methods.  
**Key words:** preservation of microorganisms, lyophilization, cryoconservation, genotype, phenotype.

**For citation:** Lebedeva A.Yu., Solomentseva A.E., Barkova M.R., Sukharicheva N.A. Genetic stability of microbial cultures in preservation. Bacteriology. 2024; 9(1): 95–104. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-95-104

**К** настоящему времени бактериальные культуры нашли широкое применение в различных отраслях человеческой деятельности [1]. Использование микроорганизмов в качестве референтных в научных, промышленных, сельскохозяйственных, экологических и медицинских исследованиях предполагает хранение штаммов в лабораториях и коллекциях культур. На сегодняшний день существует множество методов хранения, однако нет универсального способа, который бы подходил для всех видов микроорганизмов.

Раньше основным критерием качества метода хранения считалась выживаемость микроорганизмов на этапе восстановления культуры, а также сохранение их фенотипических

свойств. В настоящее время повышенное внимание уделяется поддержанию генетической стабильности исходных штаммов, так как на формирование фенотипа микроорганизма ключевое влияние оказывает его генотип. В литературе отмечаются мутационные изменения коллекционных штаммов, что приводит к развитию нескольких лабораторных линий одного штамма с различными фенотипическими свойствами [2]. Это, в свою очередь, может повлиять на релевантность результатов исследований, проводимых с использованием этих штаммов в разных лабораториях.

Мутации микробных культур могут быть вызваны различными причинами, в т.ч. спонтанным мутагенезом, условиями

### Для корреспонденции:

Лебедева Анастасия Юрьевна, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболensk, территория «Квартал А», 24  
Телефон: (4967) 31-19-19  
E-mail: lebedeva@obolensk.org

Статья поступила 28.08.2023, принята к печати 29.03.2024

### For correspondence:

Anastasia Yu. Lebedeva, Junior Researcher of Culture Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation  
Phone: (4967) 31-19-19  
E-mail: lebedeva@obolensk.org

The article was received 28.08.2023, accepted for publication 29.03.2024



культивирования и качеством сред, а также способом хранения. В зависимости от метода хранения микробные культуры подвергаются действию многих стрессовых факторов, таких как вакуум, низкие температуры, изменение осмотического давления.

В настоящем обзоре представлены преимущества и недостатки краткосрочных и долгосрочных методов хранения культур. Рассмотрен вопрос генетической стабильности и описаны основные причины возникновения мутаций в результате хранения микроорганизмов.

### Основные способы хранения микроорганизмов

Существуют методы непродолжительного и долгосрочного хранения микроорганизмов. Выбор способа хранения обычно определяется особенностями микроорганизма, целями и задачами исследования, наличием специального оборудования.

Методы непродолжительного хранения относительно просты, не требуют дорогостоящего оборудования и незаменимы в повседневной работе с микроорганизмами. К ним относятся: субкультивирование [3–5], хранение под минеральным маслом [6–8], в воде и водно-солевых растворах [9, 10], замораживание и хранение при температуре ниже точки кристаллизации воды [11] и на сорбентах влаги [12].

Для долгосрочного хранения микроорганизмов используются следующие методы: консервация замораживанием при низких температурах [13–15], сублимационное высушивание [16, 17], консервация высушиванием из жидкого состояния [18]. Эффект консервации методами сублимационной сушки и замораживанием достигается тем, что клетки, лишаясь свободной воды в условиях криогенных температур, переходят в состояние анабиоза. Изменение скорости реакций в микробной клетке достигается путем понижения температуры и удалением воды, что ведет к снижению скорости всех химических реакций или их полному прекращению. Известно, что основным фактором, обеспечивающим протекание биохимических процессов в клетке, является вода. Она составляет от 75 до 85% от массы микробной клетки, служит дисперсионной средой для коллоидов, растворителем для кристаллоидов и сама является компонентом многообразных реакций. Потеря влаги ведет к замедлению жизнедеятельности микробной клетки [19].

Метод субкультивирования позволяет поддерживать микробные штаммы благодаря периодическим пересевам культур на свежие питательные среды [3]. Среда для культивирования, температура хранения и временной интервал, через который осуществляются пересевы, различаются в зависимости от вида перевиваемых культур и должны быть установлены заранее.

Высушивание биоматериалов из замороженного состояния (лиофилизация, сублимационное высушивание, замораживание-высушивание) – широко распространенный способ, при котором вода испаряется в условиях вакуума без оттаивания льда. При использовании данного способа многие физиологически разнородные виды бактерий и бактериофаги удается сохранять в жизнеспособном состоянии в течение длительного времени, если высушенные клетки защищены от воздействия кислорода, влаги и света [20]. Данный метод позволяет защитить культуры от загрязнения

во время хранения [21]. Однако во время сублимационной сушки клетки находятся в неблагоприятных условиях, таких как низкая температура и низкая активность воды, что снижает их жизнеспособность [22].

Консервация замораживанием при низких температурах, или криоконсервация, сегодня широко используется для длительного сохранения биологических функций самых разных клеток. Консервирование путем замораживания (например, до температуры жидкого азота) является одним из эффективных методов хранения микроорганизмов, поскольку обладает большой универсальностью, сокращает процедуру пробоподготовки, а также снижает рабочую нагрузку на персонал и риск заражения по сравнению с рутинным субкультивированием. Успех криоконсервации зависит от нескольких факторов: стадии роста и концентрации микроорганизмов, скорости замораживания и оттаивания, а также использования криопротекторов [16].

В литературе известно мнение, что стандартные протоколы консервации не подходит для определенных групп микроорганизмов [16, 23, 24]. Для бактерий, которые подвержены криоповреждению или гибнут после консервации, должны быть разработаны специальные протоколы хранения, чтобы обеспечивать оптимальные условия хранения.

В отношении долгосрочного хранения культур в коллекциях Всемирная федерация коллекций культур (The World Federation for Culture Collections/WFCC) разработала и опубликовала рекомендации по поддержанию культур [25]. Данная организация признает, что различные микроорганизмы часто требуют специальных методов консервации для обеспечения сохранения жизнеспособности культуры и ее чистоты. Согласно рекомендациям, чтобы свести к минимуму вероятность потери штаммов, каждый штамм следует сохранять, когда это практически возможно, с помощью хотя бы двух разных методов. По крайней мере один из них должен осуществляться путем сублимационной сушки (лиофилизации) или криоконсервации.

### Накопление мутаций в результате хранения микроорганизмов

Благодаря использованию методов полногеномного секвенирования удалось обнаружить различия в геномах одних и тех же штаммов в различных коллекциях, что показано в работах ряда авторов. Так, в работе 2018 г. Y.W.Kwon et al. сравнили полный геном коллекционного штамма *Lactobacillus rhamnosus* GG KCTC 5033 из Корейской коллекции типовых культур (Korean Collection for Type Cultures/KCTC), полученного из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection/ATCC), с полным геномом исходного штамма *L. rhamnosus* GG ATCC 53103. При сравнении был выявлен 41 однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism/SNP). Предполагается, что одиночные мутации произошли случайным образом в течение периода хранения в KCTC после субдепонирования из ATCC (таблица).

Полученные данные показывают, что большинство геномов бактериальных культур, хранящихся в биоресурсных центрах, коллекциях культур или лабораториях, могут быть изменены в результате случайного мутагенеза [26].

M.Desroches et al. сравнили геномы изолятов *Escherichia coli* из английской (NCTC86), французской (CIP61.11), аме-

Таблица. Преимущества и недостатки различных методов хранения микроорганизмов  
 Table. *Advantages & disadvantages of different methods of microbial preservation*

Вид хранения микроорганизмов / <i>Methods of microbial preservation</i>	Преимущества метода / <i>Advantages of the method</i>	Недостатки метода / <i>Disadvantages of the method</i>	Ссылки <i>Ref.</i>
На сорбентах влаги (почва, уголь, бумага, песок, смолы и др.) / <i>Using moisture sorbents (soil, coal, paper, sand, resins, etc.)</i>	Простота исполнения, отсутствие необходимости в дополнительном оборудовании, экономическая эффективность и надежность с точки зрения жизнеспособности бактериальных культур, подходит для длительного хранения спорообразующих культур / <i>Simple to use, no need for extra equipment, economic efficiency and reliability in terms of viability of bacterial cultures, suitable for long-term storage of spore-forming cultures</i>	Длительная стерилизация некоторых твердых носителей, риск потери штаммов / <i>Prolonged sterilization of some solid carriers, risk of strain loss</i>	12
Под минеральным маслом / <i>Under mineral oil</i>	Простота исполнения, отсутствие необходимости в дополнительном оборудовании / <i>Simple to use, no need for extra equipment</i>	Возможность заражения переносимыми по воздуху спорами, замедленный рост при восстановлении, рост в неблагоприятных условиях, что может привести к селекции определенных клонов / <i>Risk of infection with airborne spores, delayed growth during recovery, possibility of clone selection</i>	6, 7, 8
В воде и водно-солевых растворах / <i>In water and salt aqueous solutions</i>	Простота исполнения, отсутствие необходимости в дополнительном оборудовании / <i>Simple to use, no need for extra equipment</i>	Ограниченное время хранения / <i>Limited time of preservation</i>	9, 10
Замораживание при температурах ниже точки кристаллизации воды / <i>Freezing at temperatures below the water crystallization point</i>	Простота исполнения, отсутствие необходимости в дополнительном оборудовании / <i>Simple to use, no need for extra equipment</i>	Не подходит для криочувствительных бактерий / <i>Not for cryo-susceptible bacteria</i>	11
Субкультивирование / <i>Subculturing</i>	Простота исполнения, отсутствие необходимости в дополнительном оборудовании / <i>Simple to use, no need for extra equipment</i>	Метод непродолжительного хранения, риск контаминации бактериальных культур, риск возникновения мутаций / <i>Short-term preservation method, risk of bacterial culture contamination, risk of mutagenesis</i>	3, 4, 5
Сублимационное высушивание / <i>Freeze-drying</i>	Защита культуры от загрязнения во время хранения, обеспечение простого способа транспортировки культур, подходит для многих видов культур / <i>Protecting cultures from contamination during storage, providing an easy way to transport cultures, suitable for many types of cultures</i>	Трудоемкость в исполнении, не подходит для чувствительных к высушиванию бактерий / <i>Laborious procedure, not suitable for dry-sensitive bacteria</i>	16, 17
Консервация замораживанием при низких температурах / <i>Low-temperature freezing preservation</i>	Большая универсальность, сокращение процедуры пробоподготовки, эффективное подавление активности микроорганизмов, снижение рабочей нагрузки на персонал и риска заражения, подходит для многих видов культур / <i>Great versatility, shortened sample preparation procedure, effective inhibition of microbial activity, reduced workload and risk of infection, suitable for many types of cultures</i>	Риск криоповреждения клеток, не подходит для криочувствительных бактерий / <i>Risk of cells cryodamage, not suitable for cryo-sensitive bacteria</i>	13, 14, 15
Консервация высушиванием из жидкого состояния / <i>Liquid drying</i>	Подходит для культур, чувствительных к замораживанию / <i>Suitable for freeze-susceptible cultures</i>	Требует специализированного оборудования / <i>Specialized equipment is needed</i>	18

риканской (ATCC 4157) и немецкой (DSM301) коллекций, а также сравнили полученные данные с геномами штаммов в базе данных NCBI *E. coli* MG1655 [27] и *E. coli* CIP2.83 [28]. В исследуемых геномах было обнаружено случайное распределение мутаций по всей хромосоме. Во всех четырех изолятах авторы выделяют ряд мутаций в генах системы репарации *E. coli*, такие как: делеции в гене *mutL*, трансверсии и сдвиг рамки считывания гена *mutT*. Также исследуемые штаммы демонстрировали высокую частоту мутаций в гене домашнего хозяйства *rpoB*, кодирующем β-субъединицу РНК-полимеразы [29]. Ряд мутаций был обнаружен в генах белков поринов (*ompF* и *acrB*, *acrE*, *acrS*), участвующих в

диффузии питательных веществ. Появление мутаций в этих генах во время консервации может играть важную роль при обмене общей устойчивости штамма к стрессу на улучшенный метаболизм, чтобы обеспечить выживание в условиях голода, вызванных хранением. Основными причинами накопления мутаций в коллекционных штаммах можно считать стрессовые условия при подготовке к длительному хранению и непрерывное лабораторное субкультивирование [30].

J.Klockgether et al. заметили некоторые генетические несоответствия у штаммов *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, хранящихся в разных лабораториях. Авторы взяли за основу существующую последовательность генома PAO1-UW и

сравнили с последовательностями геномов эталонных штаммов MPAO1 и PAO1-DSM, хранящихся в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур, с помощью физического картирования и секвенирования на платформе Illumina. Штамм MPAO1 был источником мутантов с транспозонными вставками, а PAO1-DSM идентичен по своей рестрикционной карте SpeI-DpnI исходному изоляту. По сравнению со штаммом PAO1-UW у штаммов MPAO1 и PAO1-DSM были обнаружены следующие отличия в геноме: отсутствие большой инверсии, дупликация мобильной области профага размером 12 т.п.н., несущей отдельную интегразу и протеинфосфатазы или киназы, делеции от 3 до 1006 п.н. и не менее 39 SNP, затрагивающих последовательности белков. Сублинии PAO1 различались по своей способности справляться с ограничением питательных веществ и разной вирулентностью в модели острой инфекции дыхательных путей у мышей. Таким образом, лабораторные процедуры привели к появлению широкого спектра генотипов PAO1 за последние 50 лет. В настоящее время высокопроизводительное ресеквенирование становится надлежащим контролем качества геномов штаммов микроорганизмов [31].

Работы Y.W.Kwon et al., M.Desroches et al., J.Klockgether et al. наглядно показывают, что в коллекциях микроорганизмов может происходить изменение эталонных штаммов как вследствие хранения микроорганизмов, так и в результате субкультивирования.

Как известно, метод субкультивирования не используется для длительного хранения коллекций культур различных штаммов, поскольку не может предотвратить изменения их генотипа и фенотипа. Так, например, N.R.Ratib et al. изучили влияние периодического культивирования *E. coli* K-12 в течение 1200 дней на процесс накопления мутаций. В ходе эксперимента было выделено 1117 клонов из 24 временных точек и отсекуено с использованием технологий Illumina NextSeq и HiSeq. В 5 мл бульона LB вносили приблизительно  $10^6$  КОЕ *E. coli* K-12 и отбирали по 10 мкл пробы на 10, 20 и 30-й дни и каждые последующие 30 дней. Плотность популяции увеличилась более чем в 1000 раз – до  $5 \cdot 10^9$  КОЕ/мл – после экспоненциального роста в 1-й день. После стационарной фазы и фазы гибели размер популяции оставался примерно  $5 \cdot 10^7$  КОЕ/мл между 10-м и 60-м днями (рисунок, А). Количество мутаций на клон увеличивалось с течением времени, при этом клоны с 1200-го дня приобретали в среднем 18 мутаций (рисунок, В). Было идентифицировано 679 уникальных мутаций во всех клонах, в т.ч. 147 несинонимичных SNP, 376 новых вставок элементов инсерционной последовательности (Insertion sequence/IS), 14 больших делеций (от 100 п.н. до 64 т.п.н.) и 14 дупликаций (от 50 до 500 т.п.н.) (рисунок, С). Из 376 идентифицированных новых вставок IS-элементов 331 являются исключительно IS2-элементами, и большинство из них произошло между 270-м и 600-м днями (рисунок, С) [32]. Большинство мутировавших генов кодируют белки, участвующие в метаболизме, транспорте или регуляции транскрипции, позволяющие *E. coli* адаптироваться в условиях недостатка питания.

Известно, что при субкультивировании штаммы *Borrelia* могут сохраняться в течение недель, месяцев и даже лет, но это может привести к потере некоторых линейных, а также кольцевых плазмид [33]. Утрата некоторых плазмид может

изменить экспрессию ряда генов и способность бактерий заражать лабораторных животных [33]. Urška Glinšek Biškup et al. оценили корреляцию между продолжительностью культивирования и потерей плазмид в 34 штаммах *Borrelia* трех разных видов – *B. afzelii*, *B. garinii* и *B. burgdorferi sensu stricto*. В процессе длительного культивирования *in vitro*, состоящего из 50 пассажей, потеря плазмид была установлена у 46% штаммов *B. afzelii*, 40% штаммов *B. garinii* и 36% штаммов *B. burgdorferi* s.s. Потеря плазмид происходила между 5-м и 10-м пассажами, затрагивала только плазмиды в диапазоне 9-41 т.п.н., но не плазмиды в диапазоне 50–68 т.п.н. В результате штамм терял от одной до трех плазмид. Потенциальные выгоды и недостатки потери плазмид *Borrelia*, кроме утраты вирулентности, продолжают изучаться [34].

Генетическая стабильность музейных штаммов играет важную роль для использования их в изучении патогенеза, средств профилактики и лечения на биомоделях. Несмотря на введение международных стандартов, правил ведения коллекционных культур, например The Microbial Resource Research Infrastructure/MIRRI, Organization for Standardization/ISO [35], и периодический мониторинг геномов микроорганизмов, наблюдается накопление мутаций в коллекционных штаммах. Изучение причин возникновения мутаций и разработка новых стандартов и методов для хранения штаммов в коллекционных фондах остаются актуальными и на сегодняшний день.

#### Причины возникновения мутаций при хранении микроорганизмов

Разные методы хранения микроорганизмов предполагают различные стрессовые факторы, ведущие к появлению мутаций и увеличению их частоты. К одной из основных причин появления мутаций относятся ошибки во время репликации и рекомбинации. Эти процессы, как правило, приводят к неоднородности частоты мутаций на интервалах <1 kb [36]. S.Avrani et al. провели ряд эволюционных экспериментов, направленных на выяснение адаптации *E. coli* в условиях длительной стационарной фазы. Авторы наблюдали, что во всех независимо развивающихся популяциях *E. coli* более чем в 90% клеток происходят мутации в одном из трех участков основного фермента РНК-полимеразы. Мутации в генах РНК-полимеразы участвуют в адаптации к различным стрессам, включая высокие температуры, низкое содержание питательных веществ, воздействие ионизирующего излучения и истощение ресурсов [37].

Причинами появления мутаций могут быть различные стрессовые условия, приводящие к нарушению устойчивого метаболизма микроорганизмов. Например, клетки, растущие на бедной среде в присутствии источника углерода, который они не могут использовать, производят наиболее конкурентоспособных мутантов, способных его утилизировать [38]. У *Pseudomonas putida* появлялись единичные мутации, за счет которых происходит расширение диапазона ферментов для деградации органических соединений, таких как ксилон-моноксигеназа [38, 39] и катехол-диоксигеназа [38, 40].

Помимо влияния обедненных питательных сред на появление мутаций в геноме бактерий прямое воздействие также могут оказывать супероксидный, осмотический стресс

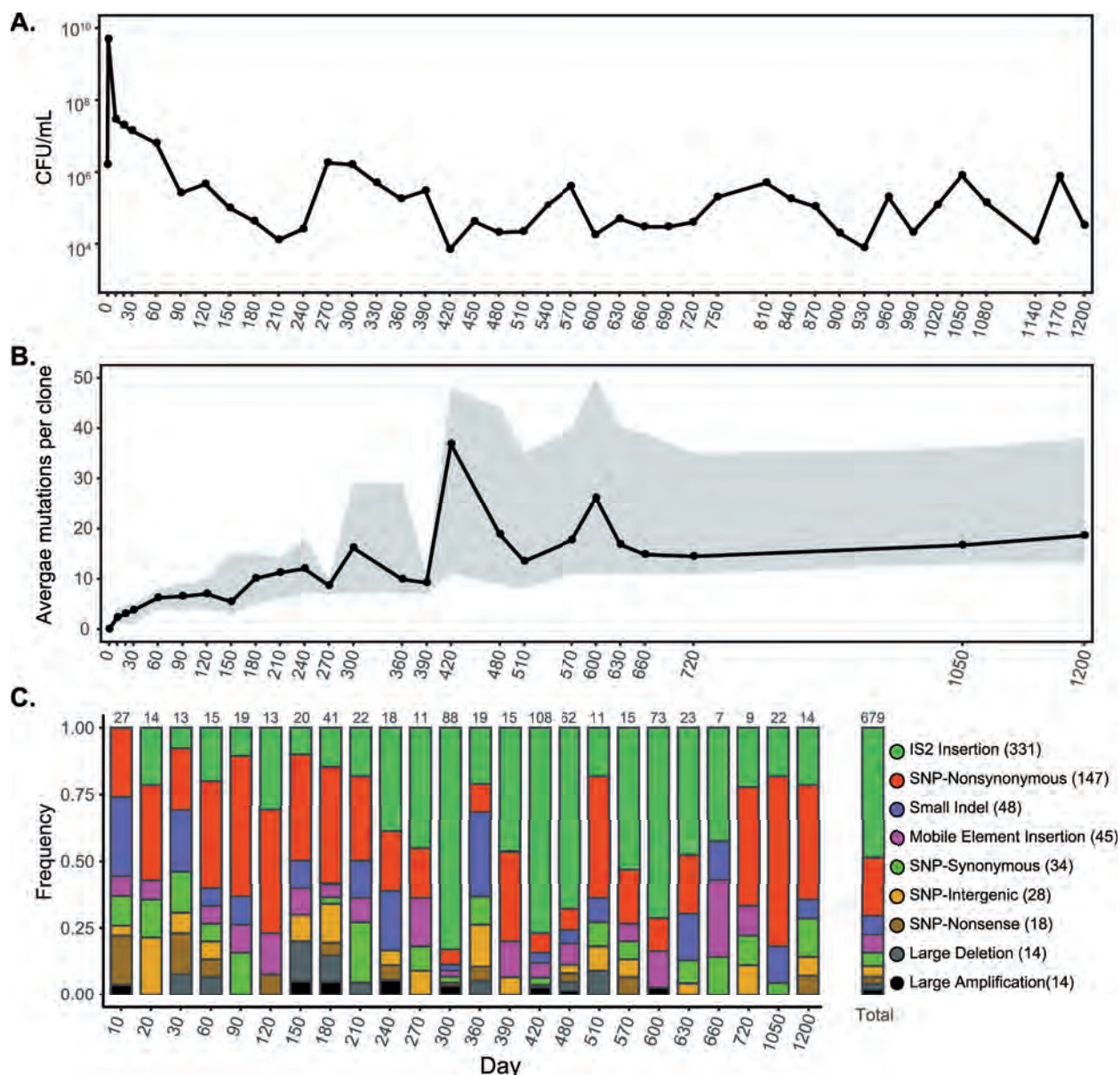


Рисунок. Плотность популяции, количество и частота мутаций, обнаруженных в *E. coli* в течение 1200 дней инкубации в периодической культуре. (А) Плотность популяции показана в виде КОЕ/мл на полулогарифмическом графике. (В) Среднее количество мутаций на клон для каждого момента времени, когда клоны были секвенированы, нанесено на график с диапазоном, показанным серым цветом. (С) Показаны частоты идентифицированных вставок IS2, несинонимичных мутаций, небольших вставок в диапазоне от 1 до 16 п.н., вставок мобильных элементов, синонимичных мутаций, межгенных SNP, нонсенс-мутаций, больших делеций в диапазоне от 100 п.н. до 64 т.п.н. и больших амплификации для 1117 клонов, секвенированных в 24 временных точках. Частота каждого типа мутации также показана для всех временных точек. Количество идентифицированных мутаций показано над каждой полосой.

Fig. Population density, number, and frequency of mutations detected in *E. coli* during 1,200 days of incubation in a long-term batch-culture evolution experiment. (A) The population density is shown as CFU/ml on a semi-log plot. (B) The average number of mutations per clone for each time point where clones were sequenced is graphed with the range shown in gray. (C) The frequencies of identified IS2 insertions, nonsynonymous mutations, small indels ranging from 1 to 16 bp, mobile element insertions, synonymous mutations, intergenic SNPs, nonsense mutations, large deletions ranging from 100 bp to 64 kbp, and large amplifications are shown for the 1,117 clones that were sequenced across 24 time points. The frequency of each mutation type is also shown for all time points. The number of mutations identified is shown above each bar [32].

и изменение температуры. Massey et al. отметили появление делеций в геномах и суперскрученности ДНК бактерий *Salmonella Typhimurium*, выращенных при концентрациях NaCl в промежутке от 0,17 до 0,67 М [41]. Активация суперспирализации ДНК в ответ на стресс сопровождается увеличением мутаций в несколько раз за счет образования вторичной структуры, содержащей неспаренные основания, уязвимые для мутаций. Селекция клонов, содержащих по-

лезные мутации, способствует их выживанию в условиях стресса.

Изменение внешних условий среды оказывает влияние не только на накопление мутаций, но в первую очередь на экспрессию ряда генов. Так, в *E. coli* в ответ на глюкозное голодание гены *relA* и *spotT* регулируют накопление гуанозинпентафосфата и гуанозинтетрафосфата, которые инициируют каскад генов чувствительных к изменению окружаю-

щей среды. Инициация генов в ответ на глюкозное голодание, в свою очередь, влияет на улучшение проницаемости внешней мембраны и транспорт глюкозы, а также генов, кодирующих ферменты с использованием альтернативных источников углерода, таких как лактоза, мальтоза, галактоза и рибоза [38].

Вероятно, наиболее эффективным процессом преодоления стресса и ускорения эволюции является иницирование специфических механизмов обратной связи. Таким образом, стрессовые условия вызывают мутации в определенных генах, позволяющих выживать бактериальным популяциям в неблагоприятных условиях [38].

В отношении методов криоконсервации и лиофилизации в качестве стресс-факторов стоит отметить такие условия, как жесткое воздействие замораживания и сушки, которые могут привести к необратимой денатурации мембранных белков и других клеточных компонентов микроорганизма [42, 43]. Таким образом, к основным факторам стресса и изменения генетических свойств микроорганизмов в процессе лиофилизации и криоконсервации относятся окислительный стресс, стресс замораживания-оттаивания, иссушающее действие вакуума и изменение pH среды.

### Окислительный стресс

Активные формы кислорода (АФК) приводят к повреждению ДНК, мембраны, белков и считаются очень важным стрессовым фактором для бактерий [44]. В лабораторных условиях штаммы микроорганизмов подвержены окислительному стрессу при культивировании на питательных средах в результате активного аэробного роста. Применение ультрафиолетового облучения в качестве стерилизации питательных сред приводит также к образованию пероксида водорода [45–47]. Нарушения работы систем окислительной репарации ДНК (oxidative repair GO) или восстановления несоответствия ДНК (DNA mismatch repair/MMR) у бактерий делает их клетки более чувствительными к окислительному стрессу, ультрафиолетовому излучению и температуре [48].

*E. coli* адаптируется к действию пероксида водорода путем индукции ферментов каталазы, пероксидазы, глутаредоксина 1 и тиоредоксина, поглощающих радикалы и находящиеся под контролем фактора транскрипции OxyR [49]. Клетки *E. coli* с делецией гена *oxyR* были гиперчувствительны к добавлению в среду пероксида водорода и прекращали рост. У клеток *E. coli* без делеции гена *oxyR* добавление пероксида водорода вызывало всплеск мутаций, но не приводило к прекращению роста. V.Lagage et al. обнаружили, что в клетках *E. coli* дикого типа происходит некоторая задержка работы системы MMR, вследствие чего клетки становятся уязвимыми к мутагенным и токсическим эффектам гидроксильных радикалов, образующихся в результате реакции Фентона. Система MMR активно удаляет окислительные повреждения ДНК, но часть этих повреждений не поддается репарации и фиксируется в виде мутаций. Повторное добавление пероксида водорода приводит к отбору мутантов с конститутивно активным ответом OxyR [50], не приводя к появлению дополнительных мутаций, вызванных задержкой MMR [51]. Быстрое появление мутаций под действием АФК может способствовать приобретению лекарственной устойчивости и ускорять адаптацию микроорганизмов в организме хозяина [52].

C.Torres-Barcelo et al. индуцировали окислительный стресс действием пероксида водорода у штаммов дикого типа *P. aeruginosa* и штаммов, несущих делеции в системе репарации ДНК (*mutS*, *mutY*, *mutM*). Было выявлено, что штаммы с делециями более устойчивы к действию пероксида водорода, чем штамм дикого типа. Это объясняется секрецией внеклеточного фермента каталазы, разлагающей перекись водорода. У штамма с делецией в гене *mutS* секреция каталазы выше на 60% по сравнению со штаммом дикого типа [53]. Однако частота возникновения мутаций при окислительном стрессе выше у дикого типа *P. aeruginosa*, чем у штаммов с делециями [48].

### Стресс замораживания-оттаивания

Замораживание и оттаивание вызывают несколько взаимосвязанных неблагоприятных факторов, влияющих на бактериальные клетки, включая обезвоживание, гиперосмотический стресс, образование кристаллов льда, окислительный стресс и холодовой шок.

**Образование кристаллов льда** сначала происходит во внеклеточном пространстве. По мере уменьшения температуры кристаллы льда растут, клетки сжимаются, мембраны и клеточные компоненты повреждаются. При дальнейшем охлаждении кристаллы льда могут образовываться внутри клетки, что ведет к разрушению клеточных мембран и гибели клеток [54, 55].

Образование кристаллов льда зависит от скорости охлаждения. Для уменьшения негативных эффектов заморозки используют защитные растворы, например, раствор глицерина, диметилсульфоксид, сахарозу, лактозу и другие [56].

**Изменение осмотического давления.** Осмотический шок возникает при внезапном изменении концентрации растворенных веществ вокруг клетки. Так как цитоплазматическая мембрана бактериальной клетки является проницаемой для воды, удаление воды за счет образования кристаллов льда создает гиперосмотическую внеклеточную среду, которая, в свою очередь, вытягивает воду из клеток преимущественно в диапазоне температур примерно до -20°C. Изменение осмотической концентрации окружающей среды может быстро привести к нарушению основных функций клетки, уменьшению ее объема, сморщиванию плазматической мембраны и увеличению ее проницаемости [57–59].

В результате оттока воды объем клетки уменьшается в течение нескольких секунд. Этот пассивный осмотический ответ клеток включает дегидратацию клеточных компонентов и сморщивание плазматической мембраны. Повышенная проницаемость плазматической мембраны во время обезвоживания или регидратации является основной причины гибели клеток. Фактически изменение осмотического давления вызывает утечку растворимых компонентов клетки в окружающую среду [60].

Для предотвращения действия осмотического стресса на клетки используют осмопротекторы – низкомолекулярные, гидрофильные, нетоксичные молекулы. Эти вещества аналогичны соединениям, используемым в качестве криопротекторов для сохранения прокариотических клеток при замораживании [61, 62].

В исследовании Y.W.Kwon et al. было проанализировано влияние стресса замораживания-оттаивания на выживаемость штамма *L. rhamnosus* GG и на сохранение его генома. В результате 150 циклов замораживания-оттаивания были обнаружены мутации в шести генах и в межгенном пространстве. Обнаруженные мутации присутствовали в генах, кодирующих D-аланил-D-аланилкарбоксипептидазу (*dacA*) и N-ацетилмураминовую кислоту-6-фосфатэстеразу (*murQ*), которые участвуют в синтезе пептидогликана – основного компонента клеточной стенки грамположительных бактерий. Авторы отмечают, что мутации в генах *dacA* и *murQ* могут вызывать изменения ферментативной активности и влиять на сшивку между пептидными цепями и изменение синтеза пептидогликана, что приводит к снижению жесткости клеточной стенки. Также мутации были обнаружены в гене *cls*, кодирующем кардиолипин-синтазу, участвующую в синтезе билипидного слоя, и генах, кодирующих белки Wze или CpsD, которые участвуют в биосинтезе экзополисахарида или капсульных полисахаридов у бактерий. В совокупности мутации у штаммов после обработки 150 циклов замораживания-оттаивания в основном происходили в генах, связанных с биосинтезом клеточной мембраны, клеточной стенки и полисахаридов капсулы. Жесткая и высокоструктурированная клеточная оболочка необходима для поддержания клеточных структур и защиты клеток от стресса окружающей среды. Однако мутации могут привести к образованию более гибкой клеточной стенки, которая может быть полезной для переживания стресса замораживания-оттаивания [26].

**Холодовой шок.** На выживаемость клеток к холодовому шоку влияет состав среды, в которой находятся клетки, концентрация клеток, температура, скорость охлаждения. Холодовой стресс приводит к индукции набора белков, называемых белками холодового шока (cold shock proteins/CSP) [63]. Все CSP принадлежат к одному семейству близкородственных низкомолекулярных белков. Они могут связываться с одноцепочечными нуклеиновыми кислотами и расщеплять вторичные структуры, образующиеся при низких температурах. Таким образом, считается, что CSP помогают осуществлению правильного процесса транскрипции и трансляции при холодовом стрессе [64].

### Воздействие вакуума

Широко используемым из существующих методов сушки микроорганизмов для хранения является лиофилизация. При этом сушка происходит путем удаления влаги из замороженного раствора или суспензии в вакуумных условиях [65].

Обезвоживание вызывает серьезные повреждения клеточных компонентов: липидные мембраны могут изменяться с плоских бислоев на цилиндрические бислои, а углеводы, белки и нуклеиновые кислоты – подвергаться аминокарбонильным реакциям, которые приводят к поперечным сшивкам и к полимеризации биомолекул. Структурные преобразования вызывают функциональные изменения, которые могут включать ингибирование или изменение активности ферментов, изменение проницаемости мембран и изменение структуры ДНК. Это, в свою очередь, приводит к гибели клеток. Известно, что увеличение потери воды из-за воздействия вакуума приводит к частичной денатурации ДНК [66, 67].

Оценить воздействие вакуума на генетический материал микроорганизмов при лиофилизации в отдельности от других стрессовых факторов достаточно сложно. R.Moeller et al. исследовали природу повреждения ДНК в бактериальных спорах, вызванного иссушающим действием вакуума, а также специфическую систему репарации ДНК для устранения этих повреждений. Авторы предполагают, что наиболее критические повреждения в результате действия вакуума – это двухцепочечные разрывы ДНК (double-strand breaks/DSB) как у вегетативных, так и у споровых клеток. В качестве пути репарации этих повреждений рассматривается негомологичное соединение концов (non-homologous end joining/NHEJ). Чтобы исследовать способность к репарации ДНК по пути NHEJ во время прорастания спор, использовали споры *Bacillus subtilis* 168 дикого типа и мутантов с дефицитом системы репарации с мутациями в гене рекомбинации *recA*, гене SP-лиазы *spIB*, лигазоподобном гене NHEJ *ykoU* и NHEJ Ku-подобном гене *ykoV* и двойной мутант *ykoU/ykoV*. Для изучения эффекта экстремального высушивания, вызванного вакуумом, образцы подвергались воздействию сверхвысокого вакуума ( $10^{-7}$  Па) в течение 30 дней, по итогу этого воздействия авторы анализировали выживаемость образцов. После 30 дней экстремального высушивания, вызванного вакуумом, споры дикого типа и споры с мутацией в гене SP-лиазы *spIB* показали высокие уровни выживаемости (33,4 и 19,8% соответственно). В отличие от них споры, несущие мутации *recA*, *ykoU* или *ykoV*, были в 77 раз более чувствительны к действию высокого вакуума, а *ykoU/ykoV* – в 16 000 раз. Чрезвычайная чувствительность спор с дефицитом *ykoU/ykoV* к высушиванию полностью согласуется с наблюдением, что воздействие высокого вакуума индуцирует образование одноцепочечных и двухцепочечных разрывов в ДНК [68].

### Изменение pH

Для каждой культуры клеток есть свой оптимальный диапазон pH, в котором они растут. Например, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* E-012010 хорошо переносят сильно кислую среду (pH 3,0) [69]. Ряд молочнокислых бактерий лучше растут при слабокислых значениях pH: *Streptococcus thermophilus* (pH 6,5), *Lactobacillus bulgaricus* (pH от 5,8 до 6) или *Lactococcus lactis* subsp. (pH от 6,3 до 6,9) [70].

Изменение pH среды оказывает влияние как на энергетические процессы [68], так и на регуляцию генов, участвующих в катаболизме и транспорт метаболитов [71]. Так, например, S.Even et al. показали, что изменение pH *L. lactis* приводит к ингибированию транспорта питательных веществ и ферментативных реакций, а также к снижению транскрипции [72].

В процессе замораживания буферных растворов на основе фосфата натрия могут происходить сдвиги pH на 3 единицы из-за кристаллизации динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты [73]. Низкие значения pH приводят к повреждению клеточной стенки, клеточной мембраны, тем самым влияя на  $\Delta$ pH и мембранный потенциал. Изменение pH в кислую сторону цитозоля бактериальной клетки вызывает генетические повреждения и приводит к денатурации белков. Нарушается общий обмен веществ, приводящий к истощению энергии и гибели клеток [74].

Микроорганизмы могут адаптироваться к изменению pH среды. Например, у кислотоустойчивого штамма *E. coli* O157:H7 ATCC 43889 при выращивании в кислых условиях может происходить изменение экспрессии генов, связанных с регуляцией стресса. Происходит активация экспрессии генов *kdpA*, который кодирует калий-связывающую субъединицу калий-транспортирующей АТФазы, *bhsA*, который индуцирует образование биопленки у *E. coli*, и уменьшение экспрессии генов мальтозы *lamB*, *malK* и *malE* [75]. В исследовании V.Zorraquino также оценивалось образование мутаций при адаптации культур к низким значениям pH. У *E. coli*, выращенных при pH 5,5, были обнаружены мутации в следующих генах – *evgS* (сенсорная киназа), *rpoD* ( $\sigma$ 70 фактор РНК-полимеразы), *lon* (ДНК-связывающая протеаза) [76]. Wemekamp-Kamphuis et al. отметили, что замораживание *Listeria monocytogenes* в среде с низким pH вызвало экспрессию  $\sigma$ В-зависимых генов, обеспечивающих неспецифическую устойчивость к влиянию множественных стрессовых факторов. При этом выживаемость мутантных клеток *L. monocytogenes* с хромосомной делецией  $\sigma$ В в экспоненциальной фазе при pH 2,5 была в 10 000 раз ниже, чем выживаемость клеток дикого типа [77].

C.Strauss et al. провели эксперименты по накоплению мутаций у *Vibrio shilonii* AK1 при культивировании при различных значениях pH (7,76; 7,29 и 6,67). В исследовании была показана сильная положительная корреляция между значением pH и частотой мутаций, при этом скорость мутаций при pH 7,76 повышалась в 3 раза по сравнению с наблюдаемой при pH 6,67. Таким образом, более низкий pH изменял спектр мутаций *V. shilonii* в сторону образования большего количества нуклеотидов G/C [78]. Это также хорошо согласуется с результатами других исследований [79].

### Заключение

Сохранение фенотипических характеристик и поддержание генетической стабильности бактериальных штаммов является одной из ключевых задач коллекционных фондов. Для этого используются различные способы хранения микроорганизмов, как непродолжительные, так и долгосрочные. При этом процесс хранения нередко связан с действием на клетку комплекса повреждающих физико-химических факторов, таких как низкие температуры, осмотический стресс, обезвоживание, изменение pH растворов. Это становится причиной повреждения клеточных компонентов: мембран, белков и нуклеиновых кислот. При длительном хранении микроорганизмов происходит накопление мутаций в их геномах, что, в свою очередь, оказывает влияние на фенотипические характеристики штаммов. Полностью избежать воздействия стресс-факторов невозможно, однако мониторинг генетической стабильности позволяет минимизировать эти изменения и подобрать эффективные условия хранения культуры.

### Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках государственного задания по НИОКР 1.1.18.

### Financial support

The publication was carried out within the framework of the state assignment for R&D 1.1.18.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

### Литература / References

1. Sharma A, Shouche Y. Microbial Culture Collection (MCC) and International Depository Authority (IDA) at National Centre for Cell Science, Pune. Indian J Microbiol. 2014 Jun;54(2):129-33. DOI: 10.1007/s12088-014-0447-y
2. Pascoe B, Williams LK, Calland JK, Meric G, Hitchings MD, Dyer M, et al. Domestication of *Campylobacter jejuni* NCTC 11168. Microb Genom. 2019 Jul;5(7):e000279. DOI: 10.1099/mgen.0.000279
3. Kumar S, Kashyap PL, Singh R, Srivastava AK. Preservation and maintenance of microbial cultures. Analyzing Microbes. Springer Protocols Handbooks. 2013. DOI: 10.1007/978-3-642-34410-7\_11
4. Winters RD, Winn WC Jr. A simple effective method for bacterial culture storage: a brief technical report. J Bacteriol Virol. 40. 2010;99-101.
5. Samir A, Wasfy MO. A simple technique for long-term preservation of leptospires. J Basic Microbiol. 2013 Mar;53(3):299-301. DOI: 10.1002/jobm.201100551
6. Утепешева АА. Подбор методов длительного хранения коллекционных штаммов микромицетов и дрожжей. Экобиотех. 2019;2(4):494-498. / Utepeshewa AA. Selection of methods for long storage of collection strains of micromycetes and yeast. Ecobiotech. 2019;2(4):494-498. DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-4-494-498
7. Nakasone KK, Peterson SW, Jong SC. Preservation and distribution of fungal cultures. Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods (Bills G, Muller GM, Foster MS, eds). Elsevier, Amsterdam. 37-47.
8. Smith D, Ryan MJ, Day JG. The UKNCC Biological Resource: Properties, Maintenance and Management. UKNCC Secretariat: Egham, UK, 2001.
9. Liao CH, Shollenberger LM. Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline. Lett Appl Microbiol. 2003;37(1):45-50. DOI: 10.1046/j.1472-765x.2003.01345.x
10. Hutchison JR, Brooks SM, Kennedy ZC, Pope TR, Deatherage Kaiser BL, et al. Polysaccharide-based liquid storage and transport media for non-refrigerated preservation of bacterial pathogens. PLoS One. 2019 Sep 6;14(9):e0221831. DOI: 10.1371/journal.pone.0221831
11. Kuzemenská P, Burian V, Nováková E. Preservation of a *N. meningitidis* strain by freezing. A model experiment. Zentralbl Bakteriol Orig A. 1976 Oct; 236(1):16-21.
12. Kulkarni GA, Chitte RR. Preservation of thermophilic bacterial spores using filter paper disc techniques. J Bioprocess Biotechniques. 2015;5:1-3. DOI: 10.4172/2155-9821.1000223
13. Smith D, Ryan J, Stackebrandt E. The ex-situ conservation of microorganisms: aiming at a certified quality management. Biotechnology (Doelle HW, DaSilva EJ, eds). Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Developed under the Auspices of UNESCO, EOLSS Publisher, Oxford, UK, 2008.
14. Smith D, Ryan M. Implementing best practices and validation of cryopreservation techniques for microorganisms. ScientificWorldJournal. 2012;2012:805659. DOI: 10.1100/2012/805659
15. Guo N, Wei Q, Xu Y. Optimization of cryopreservation of pathogenic microbial strains. Journal of Biosafety and Biosecurity. 2020;2:66-70. DOI: 10.1016/j.job.2020.11.003.
16. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of microorganisms by drying; a review. J Microbiol Methods. 2006;66:183-193.
17. Rockinger U, Funk M, Winter G. Current approaches of preservation of cells during (freeze) drying. J Pharm Sci. 2021;110(8):2873-93. DOI:10.1016/j.xphs.2021.04.018

18. Malik KA. Liquid-drying of microorganisms using a simple apparatus. *World J Microbiol Biotechnol.* 1992; Jan;8(1):80-2. DOI: 10.1007/BF01200693
19. Охупкина ВЮ. Методы поддержания микробных культур. Часть 2. Лиофилизация. Теоретическая и прикладная экология. 2009;4:21-32. / Okhapkina VYu. Methods of microbe cultures maintenance. Part 2. Liophilisation. *Theoretical and Applied Ecology.* 2009;4:21-32. (In Russian).
20. Онищенко ГГ, Кутырев ВВ, Осин АВ. Коллекционная деятельность в области использования патогенных микроорганизмов в обеспечении биологической безопасности Российской Федерации. Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2016;1(14):37-46. / Onishchenko GG, Kutuyev VV, Osin AV. Collection activities in the sphere of pathogenic microorganisms usage for the provision of biological safety in the Russian Federation. *Infectious diseases: News, Opinions, Training.* 2016;1(14):37-46. (In Russian).
21. Bond, C. Freeze-drying of yeast cultures. *Methods Mol Biol.* 2007;368:99-107. DOI:10.1007/978-1-59745-362-2\_6
22. Bolla PA, de Serradell ML, de Urraza PJ, de Antoni GL. Effect of freeze-drying on viability and *in vitro* probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. *J Dairy Res.* 2011;78(1):15-22. DOI: 10.1017/S0022029910000610
23. Philip N, Garba B, Neela VK. Long-term preservation of *Leptospira* spp.: challenges and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018 Jul;102(13):5427-5435. DOI: 10.1007/s00253-018-9047-9
24. Hoefman S, Van Hoorde K, Boon N, Vandamme P, De Vos P, Heylen K. Survival or revival: long-term preservation induces a reversible viable but non-culturable state in methane-oxidizing bacteria. *PLoS One.* 2012;7(4):e34196. DOI: 10.1371/journal.pone.0034196
25. The WFCC Guidelines for the Establishment and Operation of Culture Collections (Online), 2010. Available at: <http://www.wfcc.info/guidelines/>
26. Kwon YW, Bae JH, Kim SA, Han NS. Development of Freeze-Thaw Tolerant *Lactobacillus rhamnosus* GG by Adaptive Laboratory Evolution. *Front Microbiol.* 2018 Nov 20;9:2781. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02781
27. Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* 1997 Sep 5;277(5331):1453-62. DOI: 10.1126/science.277.5331.1453
28. Archer CT, Kim JF, Jeong H, Park JH, Vickers CE, Lee SY, et al. The genome sequence of *E. coli* W (ATCC 9637): comparative genome analysis and an improved genome-scale reconstruction of *E. coli*. *BMC Genomics.* 2011 Jan 6;12:9. DOI: 10.1186/1471-2164-12-9
29. Jin DJ, Gross CA. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J Mol Biol.* 1988;202:45-58. DOI: 10.1016/0022-2836(88)90517-7
30. Desroches M, Royer G, Roche D, Mercier-Darty M, Vallenet D, Médigue C, et al. The Odyssey of the Ancestral *Escherichia coli* Strain through Culture Collections: an Example of Allopatric Diversification. *mSphere.* 2018 Jan 31;3(1):e00553-17. DOI: 10.1128/mSphere.00553-17
31. Klockgether J, Munder A, Neugebauer J, Davenport CF, Stanke F, Larbig KD, et al. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. *J Bacteriol.* 2010 Feb;192(4):1113-21. DOI: 10.1128/JB.01515-09
32. Ratib NR, Seidl F, Ehrenreich IM, Finkel SE. Evolution in Long-Term Stationary-Phase Batch Culture: Emergence of Divergent *Escherichia coli* Lineages over 1,200 Days. *mBio.* 2021 Jan 26;12(1):e03337-20. DOI: 10.1128/mBio.03337-20
33. Labandeira-Rey M, Skare JT. Decreased infectivity in *Borrelia burgdorferi* strain B31 is associated with loss of linear plasmid 25 or 28-1. *Infect Immun.* 2001 Jan;69(1):446-55. DOI: 10.1128/IAI.69.1.446-455.2001
34. Biškup UG, Strle F, Ružić-Sabljčić E. Loss of plasmids of *Borrelia burgdorferi sensu lato* during prolonged in vitro cultivation. *Plasmid.* 2011 Oct;66(1):1-6. DOI: 10.1016/j.plasmid.2011.02.006
35. Boundy-Mills K, Hess M, Bennett AR, Ryan M, Kang S, Nobles D, et al. The United States Culture Collection Network (USCCN): Enhancing Microbial Genomics Research through Living Microbe Culture Collections. *Appl Environ Microbiol.* 2015 Sep 1;81(17):5671-4. DOI: 10.1128/AEM.01176-15
36. Dillon MM, Sung W, Lynch M, Cooper VS. Periodic Variation of Mutation Rates in Bacterial Genomes Associated with Replication Timing. *mBio.* 2018 Aug 21;9(4):e01371-18. DOI: 10.1128/mBio.01371-18
37. Avrani S, Katz S, Hershberg R. Adaptations Accumulated under Prolonged Resource Exhaustion Are Highly Transient. *mSphere.* 2020 Aug 12;5(4):e00388-20. DOI: 10.1128/mSphere.00388-20
38. Wright BE. Stress-directed adaptive mutations and evolution. *Mol Microbiol.* 2004;52(3):643-650. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04012.x
39. Abril MA, Michan C, Timmis KN, Ramos JL. Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J Bacteriol.* 1989 Dec;171(12):6782-90. DOI: 10.1128/jb.171.12.6782-6790.1989
40. Ramos JL, Wasserfallen A, Rose K, Timmis KN. Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkylbenzoates. *Science.* 1987 Jan 30;235(4788):593-6. DOI: 10.1126/science.3468623
41. Massey RC, Rainey PB, Sheehan BJ, Keane OM, Dorman CJ. Environmentally constrained mutation and adaptive evolution in *Salmonella*. *Curr Biol.* 1999 Dec 16-30;9(24):1477-80. DOI: 10.1016/s0960-9822(00)80117-7
42. Cao-Hoang L, Dumont F, Marechal PA, Le-Thanh M, Gervais P. Rates of chilling to 0 degrees C: implications for the survival of microorganisms and relationship with membrane fluidity modifications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008 Jan;77(6):1379-87. DOI: 10.1007/s00253-007-1279-z
43. Cao-Hoang L, Dumont F, Marechal PA, Gervais P. Inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* in relation to membrane permeabilization due to rapid chilling followed by cold storage. *Arch Microbiol.* 2010 Apr;192(4):299-305. DOI: 10.1007/s00203-010-0555-y
44. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins DJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(6):423-435. DOI: 10.1038/nrmicro2333
45. Meunier SM, Sasges MR, Aucoin MG. Evaluating ultraviolet sensitivity of adventitious agents in biopharmaceutical manufacturing. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2017 Jun;44(6):893-909. DOI: 10.1007/s10295-017-1917-0
46. Rhee SG, Woo HA, Kil IS, Bae SH. Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. *J Biol Chem.* 2012 Feb 10;287(7):4403-10. DOI: 10.1074/jbc.R111.283432
47. Dare EV, Gabriel M, Begum A, Sasges M, Aucoin MG. The effect of hydrogen peroxide produced during ultraviolet disinfection of CHO cell culture media. *Process Biochemistry.* 2017;61:147-155. DOI: 10.1016/j.procbio.2017.06.025
48. Torres-Barceló C, Cabot G, Oliver A, Buckling A, Maclean RC. A trade-off between oxidative stress resistance and DNA repair plays a role in the evolution of elevated mutation rates in bacteria. *Proc Biol Sci.* 2013 Feb 27;280(1757):20130007. DOI: 10.1098/rspb.2013.0007
49. Storz G, Tartaglia LA, Ames BN. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science.* 1990 Apr 13;248(4952):189-94. DOI: 10.1126/science.2183352
50. Anand A, Chen K, Catoiu E, Sastry AV, Olson CA, Sandberg TE, et al. OxyR Is a Convergent Target for Mutations Acquired during Adaptation to Oxidative Stress-Prone Metabolic States. *Mol Biol Evol.* 2020 Mar 1;37(3):660-667. DOI: 10.1093/molbev/msz251
51. Lagage V, Chen V, Uphoff S. Adaptation delay causes a burst of mutations in bacteria responding to oxidative stress. *EMBO Rep.* 2023 Jan 9;24(1):e55640. DOI: 10.15252/embr.202255640
52. Bell G. Evolutionary rescue. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics.* 2017;48:605-627. DOI: 10.1146/annurev-evolsys-110316-023011
53. Shin DH, Choi YS, Cho YH. Unusual properties of catalase A (KatA) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 are associated with its biofilm peroxide resistance. *J Bacteriol.* 2008 Apr;190(8):2663-70. DOI: 10.1128/JB.01580-07



54. Inoue M, Nakatsuka S, Jinzaki M. Cryoablation of early-stage primary lung cancer. *Biomed Res Int.* 2014;2014:521691. DOI: 10.1155/2014/521691
55. Beal C, Fonseca F. Freezing of probiotic bacteria. *Advances in Probiotic Technology.* 2015;179-212.
56. Darwin M, Aschwin de Wolf Cde W, Gregory B, Fahy M, Michael Perry R. How cryoprotectants work. *Cryonics.* 2007;3:28.
57. Pátek M, Grulich M, Nešvera J. Stress response in *Rhodococcus* strains. *Biotechnol Adv.* 2021 Dec;53:107698. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2021.107698
58. Brauer AM, Shi H, Levin PA, Huang KC. Physiological and regulatory convergence between osmotic and nutrient stress responses in microbes. *Curr Opin Cell Biol.* 2023 Apr;81:102170. DOI: 10.1016/j.ceb.2023.102170
59. Wang M, Tian Y, Xu L, Zhang F, Lu H, Li M, et al. High osmotic stress increases ompK36 expression through the regulation of kbvR to decrease the antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Spectr.* 2022 Jun 29;10(3):e0050722. DOI: 10.1128/spectrum.00507-22
60. Simonin H, Beney L, Gervais P. Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: mechanisms of cell death. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768(6):1600-1610. DOI: 10.1016/j.bbame.2007.03.017
61. Cleland D, Krader P, McCree C, Tang J, Emerson D. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *J Microbiol Methods.* 2004. Jul;58(1):31-8. DOI: 10.1016/j.mimet.2004.02.015
62. Gaucher F, Rabah H, Kponouglo K, Bonnassie S, Pottier S, Dolivet A, et al. Intracellular osmoprotectant concentrations determine *Propionibacterium freudenreichii* survival during drying. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020 Apr;104(7):3145-3156. DOI: 10.1007/s00253-020-10425-1
63. Wouters JA, Rombouts FM, Kuipers OP, de Vos WM, Abee T. The role of cold-shock proteins in low-temperature adaptation of food-related bacteria. *Syst Appl Microbiol.* 2000 Jun;23(2):165-73. DOI: 10.1016/S0723-2020(00)80001-6
64. Budkina KS, Zlobin NE, Kononova SV, Ovchinnikov LP, Babakov AV. Cold Shock Domain Proteins: Structure and Interaction with Nucleic Acids. *Biochemistry (Mosc).* 2020 Jan;85(Suppl 1):S1-S19. DOI: 10.1134/S0006297920140011
65. Wagman J, Weneck EJ. Preservation of bacteria by circulating-gas freeze drying. *Appl Microbiol.* 1963 May;11(3):244-8. DOI: 10.1128/am.11.3.244-248.1963
66. Tang M, Zhang P, Zxu D, Wang L, Wu L. SOS induction by vacuum, desiccation and low-energy ion beam mock-irradiation in bacteria. *Annals of Microbiology.* 2009;59(4):815-821. DOI: 10.1007/bf03179228
67. Horneck G, Klaus DM, Mancinelli RL. Space microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010 Mar;74(1):121-56. DOI: 10.1128/MMBR.00016-09
68. Moeller R, Stackebrandt E, Reitz G, Berger T, Rettberg P, Doherty AJ, et al. Role of DNA repair by nonhomologous-end joining in *Bacillus subtilis* spore resistance to extreme dryness, mono- and polychromatic UV, and ionizing radiation. *J Bacteriol.* 2007 Apr;189(8):3306-11. DOI: 10.1128/JB.00018-07
69. Saarela M, Virkajärvi I, Alakomi HL, Mattila-Sandholm T, Vaari A, Suomalainen T, et al. Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* cells produced without milk-based ingredients. *J Appl Microbiol.* 2005;99(6):1330-9. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02742.x
70. Rault A, Bouix M, Béal C. Fermentation pH influences the physiological-state dynamics of *Lactobacillus bulgaricus* CFL1 during pH-controlled culture. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Jul;75(13):4374-81. DOI: 10.1128/AEM.02725-08
71. Sánchez-Clemente R, Guijo MI, Nogales J, Blasco R. Carbon Source Influence on Extracellular pH Changes along Bacterial Cell-Growth. *Genes (Basel).* 2020 Oct 30;11(11):1292. DOI: 10.3390/genes11111292
72. Even S, Lindley ND, Loubière P, Coccagn-Bousquet M. Dynamic response of catabolic pathways to autoacidification in *Lactococcus lactis*: transcript profiling and stability in relation to metabolic and energetic constraints. *Mol Microbiol.* 2002 Aug;45(4):1143-52. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.03086.x
73. Pikal-Cleland KA, Cleland JL, Anchordoquy TJ, Carpenter JF. Effect of glycine on pH changes and protein stability during freeze-thawing in phosphate buffer systems. *J Pharm Sci.* 2002 Sep;91(9):1969-79. DOI: 10.1002/jps.10184
74. Papadimitriou K, Alegria Á, Bron PA, de Angelis M, Gobetti M, Kleerebezem M, et al. Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016 Jul 27;80(3):837-90. DOI: 10.1128/MMBR.00076-15
75. Hwang D, Kim SM, Kim HJ. Transcriptome changes and polymyxin resistance of acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43889. *Gut Pathog.* 2020 Dec 1;12(1):52. DOI: 10.1186/s13099-020-00390-5
76. Zorraquino V, Kim M, Rai N, Tagkopoulos I. The Genetic and Transcriptional Basis of Short and Long Term Adaptation across Multiple Stresses in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol.* 2017 Mar 1;34(3):707-717. DOI: 10.1093/molbev/msw269
77. Wemekamp-Kamphuis HH, Wouters JA, de Leeuw PP, Hain T, Chakraborty T, Abee T. Identification of sigma factor sigma B-controlled genes and their impact on acid stress, high hydrostatic pressure, and freeze survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Jun;70(6):3457-66. DOI: 10.1128/AEM.70.6.3457-3466.2004
78. Strauss C, Long H, Patterson CE, Te R, Lynch M. Genome-Wide Mutation Rate Response to pH Change in the Coral Reef Pathogen *Vibrio shilonii* AK1. *mBio.* 2017 Aug 22;8(4):e01021-17. DOI: 10.1128/mBio.01021-17
79. Wang RY, Kuo KC, Gehrke CW, Huang LH, Ehrlich M. Heat- and alkali-induced deamination of 5-methylcytosine and cytosine residues in DNA. *Biochim Biophys Acta.* 1982 Jun 30;697(3):371-7. DOI: 10.1016/0167-4781(82)90101-4

#### Информация о соавторах:

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

Барькова Мария Рудольфовна, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Сухаричева Наталия Алексеевна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

#### Information about co-authors:

Aleksandra E. Solomentseva, Junior Researcher of Culture Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Maria R. Barkova, Junior Researcher of Culture Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Natalia A. Sukharicheva, PhD, Junior Researcher of Culture Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

# Микробиологические маркеры риска развития несостоятельности швов после кесарева сечения

Д.В.Старикова<sup>1</sup>, Л.В.Коломбет<sup>2</sup>, Н.В.Богачева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет», Киров, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск, Российская Федерация

За последние двадцать лет во всем мире отмечается рост оперативных родоразрешений. Частота абдоминального родоразрешения в некоторых регионах России возросла до 47,4%, и это не обходится без увеличения риска развития послеоперационных осложнений. Среди наиболее значимых гнойно-септических осложнений, которые являются причиной материнской смертности, следует отметить послеродовый акушерский перитонит и послеродовый акушерский сепсис. Их распространенность составляет не менее 2% от всех оперативных родов, но именно эти осложнения являются значимыми. Среди прочих гнойно-септических осложнений, способствующих развитию несостоятельности швов на передней брюшной стенке, следует выделить инфекцию хирургической акушерской раны. В качестве основной причины инфекции хирургической акушерской раны после кесарева сечения выдвигается микробная контаминация. Роль конкретных микроорганизмов в развитии инфекции хирургической акушерской раны до конца не установлена. Течение инфекции в организме у родильниц характеризуется изменением видового спектра микроорганизмов, трансформацией клинической симптоматики в сторону стертых и атипичных форм, поздней диагностикой и запоздалым началом лечения. Результаты научных исследований, посвященные изучению особенностей микробиоценоза послеоперационной раны на передней брюшной стенке у женщин после кесарева сечения, представлены в данном обзоре. **Ключевые слова:** кесарево сечение, микробная контаминация, гнойно-септические осложнения, инфекция хирургической акушерской раны, несостоятельность швов после кесарева сечения, значимые микроорганизмы

**Для цитирования:** Старикова Д.В., Коломбет Л.В., Богачева Н.В. Микробиологические маркеры риска развития несостоятельности швов после кесарева сечения. Бактериология. 2024; 9(1): 105–108. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-105-108

## Microbiological markers of the risk of suture failure after cesarean section

D.V.Starikova<sup>1</sup>, L.V.Kolombet<sup>2</sup>, N.V.Bogacheva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kirov State Medical University, Kirov, Russian Federation;

<sup>2</sup>State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Many countries have seen a rise in their cesarean section (C-section) over the past twenty years. In some regions of Russia, the C-section incidence varies to 47,4 %, and this is not without an increase in the risk of postoperative complications. Among the most significant purulent-septic complications that are the cause of maternal mortality, postpartum obstetric peritonitis and postpartum obstetric sepsis should be noted. The prevalence of these complications is at least 2% of all surgical deliveries, but these complications are significant. Among other purulent-septic complications that contribute to the development of insolvency of the sutures on the anterior abdominal wall, infection of the surgical obstetric wound should be distinguished. The theory of microbial contamination is put forward as the main cause of infection of the surgical obstetric wound after cesarean section. The role of specific microorganisms in the development of surgical obstetric wound infection has not been fully established. The course of infection in the body of puerperas is characterized by a change in the species spectrum of microorganisms, the transformation of clinical symptoms towards erased and atypical forms, late diagnosis and belated start of treatment. The results of scientific research devoted to the study of the characteristics of the microbiocenosis of the postoperative wound on the anterior abdominal wall in women after caesarean section are presented in this review.

**Key words:** caesarean section, microbial contamination, purulent-septic complications, infection of the surgical obstetric wound, disclosure for suture (scar) incompetence, significant microorganisms

**For citation:** Starikova D.V., Kolombet L.V., Bogacheva N.V. Microbiological markers of the risk of suture failure after cesarean section. Bacteriology. 2024; 9(1): 105–108. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-1-105-108

### Для корреспонденции:

Старикова Дарья Валерьевна, аспирант кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет»

Адрес: 610998, Киров, ул. К.Маркса, 112  
Телефон: (919) 514-5744

Статья поступила 03.11.2024, принята к печати 29.03.2024

### For correspondence:

Daria V. Starikova, Postgraduate Student of the Department of Microbiology and Virology of the Kirov State Medical University

Address: 112 K.Marx str., Kirov, 610998 Russian Federation  
Phone: (919) 514-5744

The article was received 03.11.2024, accepted for publication 29.03.2024

**В** настоящее время расширился спектр показаний для оперативного родоразрешения. Несмотря на то, что кесарево сечение (КС) является полостной операцией и относится к одной из сложных хирургических операций, данный способ занимает лидирующие позиции среди технологичных родовспоможения, так как позволяет предотвратить опасность возможных осложнений в родах, сохраняя здоровье матери и ребенка. Частота абдоминального родоразрешения за последние 10 лет в некоторых регионах России возросла до 47,4%, и это не обходится без увеличения риска развития послеоперационных осложнений [1].

Послеродовой период после оперативных родов, даже при физиологическом течении, является благоприятным для развития инфекционных осложнений. Среди наиболее значимых гнойно-септических осложнений, являющихся причиной материнской смертности, следует отметить послеродовой акушерский перитонит и послеродовой акушерский сепсис. Распространенность данных осложнений составляет не менее 2% от всех оперативных родов. Среди прочих гнойно-септических осложнений, способствующих развитию несостоятельности швов на передней брюшной стенке, следует выделить инфекцию хирургической акушерской раны. Частота встречаемости инфекции раны на брюшной стенке после КС достигает 43% [2, 3].

Инфекция хирургической акушерской раны после оперативных родов чаще всего обусловлена бактериальной контаминацией, причем первые клинические проявления данной патологии начинают беспокоить пациенток, по данным научных исследований, через 7 дней после родов [4]. Однако обычно пациентку выписывают из родильного дома на 3–4-е сутки при условии отсутствия признаков инфекционных осложнений по результатам анализа лабораторных показателей и оценке родовых путей, а также шва на передней брюшной стенке на предмет присоединения воспалительного процесса. Отсутствие воспалительного процесса на 3–4-е сутки не дает точных гарантий, что воспаление не начнет развиваться позже – к началу 7–8-х суток. Ключевым моментом в предупреждении развития инфекции послеоперационной раны является наблюдение за пациенткой в течение всего послеродового периода. При наличии первых клинических и лабораторных изменений, свидетельствующих о присоединении инфекции после операции КС, необходимо провести микробиологическую идентификацию этиологических агентов, участвующих в развитии гнойно-септического осложнения. Для этого целесообразно параллельно идентифицировать микроорганизмы в биологическом материале из владалища и шва на передней брюшной стенке, определить их видовую принадлежность и чувствительность к антимикробным препаратам. В настоящее время микробиологический спектр основных участников в развитии воспалительного процесса на передней брюшной стенке до конца не изучен. Отсутствуют данные о видовом единобразии основных патогенов, присутствующих в биотопе владалища и на коже передней брюшной стенки, как о причине развития инфекции хирургической акушерской раны. Мнения исследователей о видовом составе микробиоценоза и значимости участия отдельных представителей микробиоты в развитии и прогрессировании процесса после оперативных родов неоднозначны, что обосновывает актуальность детального из-

учения данного вопроса. Рассмотрим результаты научных исследований, которые посвящены данной проблеме.

Так, например, в исследованиях А.Т.Егоровой и соавт. доказано, что некоторые микроорганизмы представители родов *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Porphyromonas* spp., *Clostridium* spp., *Actinomyces* spp., *Mobiluncus* spp., *Streptococcus* spp. (включая группы А и В), *Chlamydia* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp. и *Klebsiella* spp. ассоциированы не только с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта, но и с акушерскими осложнениями. Это означает, что при выделении данных микроорганизмов из половых путей или из шва в послеоперационном периоде возникает опасность восходящей инфекции и, как результат, развития инфекции хирургической акушерской раны, перитонита, сепсиса и других послеоперационных осложнений [5].

Данные исследования подтверждают J.D.Sobel и D.E.Soper в работе «Infections and Sexually Transmitted Diseases», которые обосновали связь гинекологических воспалительных заболеваний, перенесенных во время беременности, с развитием осложнений после оперативных родов. По результатам работы данных авторов определена зависимость микроорганизмов, выделенных из половых путей и шва на передней брюшной стенке, от существовавших ранее инфекций во время беременности, таких, например, как острый вагинит. Авторы доказали, что перенесенный во время беременности острый вагинит является значимым фактором риска развития осложнений в послеродовом периоде [6].

В.И.Краснопольский и соавт. отмечают, что ведущими этиологическими агентами в формировании инфекции хирургической акушерской раны являются *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, *Streptococcus agalactiae* [7].

По мнению И.В.Бычкова и соавт., высокая частота встречаемости микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* как независимо, так и в ассоциации с другими микроорганизмами (например, с *S. aureus* в 31,0% случаев) свидетельствует о возможном распространении инфекции из половых путей и матки в ткани брюшной стенки [8].

Т.Ю.Пестрикова с соавт. считают, что достоверным признаком развившегося послеродового гнойно-воспалительного заболевания является выделение этиологически значимых микроорганизмов в концентрации  $\geq 1 \cdot 10^3$  КОЕ/мл [9].

В экспериментальном исследовании Ш.А.Докудаевой и соавт. высчитана конкретная концентрация бактерий, выраженная в геном-эквиваленте в образце (ГЭ/образец), которая способствует риску развития инфекционного осложнения после оперативных родов. Риск развития осложнений после оперативных родов при контаминации родовых путей микроорганизмами в концентрации  $10^7$ – $10^{10}$  ГЭ/образец проявляется, если это представители родов *Staphylococcus* spp. – в 100%, *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp. и *Klebsiella* spp. – в 85,2%, рода *Streptococcus* spp. – в 74,1%, вида *Ureaplasma* spp. – в 70,4% случаев [10].

В исследовании В.Т.Рыскельдиевой и соавт., в котором обследовали 471 пациентку, отмечена высокая частота встречаемости ассоциаций представителей родов условно-патогенных микроорганизмов в биологическом материале

из цервикального канала и шва на передней брюшной стенке, таких как *Streptococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Candida* spp., *Enterobacter* spp., *Shigella* spp., *Enterococcus* spp., а также *Staphylococcus* spp. Но некоторые из этих микроорганизмов выделялись при обследовании половых путей и у пациенток без осложненного послеоперационного периода. Это подтверждает тот факт, что для развития инфекционных осложнений необходимы условия (например, ослабление защитных функций иммунной системы), которые бы способствовали проявлению патогенных свойств условно-патогенными микроорганизмами [11].

Это подтверждается результатами работы В.В.Рыжкова с соавт., которые доказали, что прослеживается прямая зависимость между степенью микробной контаминации акушерской раны и половых путей после КС, с одной стороны, и тяжестью течения сопутствующих соматических заболеваний – с другой [12]. Результаты данного исследования свидетельствуют о зависимости тяжести развития послеоперационного осложнения от наличия иммунодефицита в организме женщины, формируемого имеющейся в анамнезе соматической патологией.

Изучая возможность присоединения анаэробной инфекции в послеродовом периоде, Н.А.Коробков и соавт. сформировали ранговую последовательность значимости участия представителей отдельных родов микроорганизмов в развитии послеродовых осложнений, которую можно представить следующим образом: *Peptostreptococcus* spp. – *Bacteroides* spp. – *Enterococcus* spp. – *Staphylococcus* spp. – *Enterobacter* spp. – *Escherichia* spp. – *Veillonella* spp. [13].

Н.А.Коробков статистически обосновал значимые микроорганизмы в развитии послеоперационных осложнений в послеродовом периоде, среди которых представители рода *Peptostreptococcus* (*P. magnus*, *P. anaerobius*); рода *Bacteroides* (*B. utealyticum*, *B. fragilis*, *B. vulgatus*, *B. ovatus*, *B. distasonis*); рода *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium*); рода *Staphylococcus* (*S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. aureus*); рода *Enterobacter* (*E. agglomerans*, *E. cloaca*); рода *Escherichia* (*E. albertii*, *E. coli*, *E. faecalis*); рода *Veillonella* (*V. parvula*). Кроме того, автор предположил, что необходимо учитывать количественную обсемененность этими бактериями полости матки. В данном исследовании чаще наблюдался высокий уровень бактериальной обсемененности –  $\geq 10^5$  КОЕ/мл [13].

В своем исследовании М.А.Курцер и соавт. выдвинули теорию и экспериментально подтвердили, что в подавляющем большинстве случаев этиологической причиной послеродовых осложнений являются ассоциации микроорганизмов, среди которых лидирующие позиции занимают такие, как *E. faecalis* и *E. faecium*, *E. coli* и *S. aureus*, причем уровень бактериальной контаминации данными видами в ассоциации должен составлять  $\geq 10^5$  КОЕ/мл [14].

В исследовании С.С.Смирновой и соавт. обоснованы этиологические агенты, которые являются причиной развития инфекционных осложнений после КС. К данным микроорганизмам относятся представители микрофлоры кожи, влагалища или кишечника родильницы, среди которых – *E. faecalis*, *Corynebacterium* spp., *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. Среди грибковой флоры чаще других идентифицируют *Candida albicans* [15].

Таким образом, проблема видового спектра микроорганизмов, являющихся причиной контаминации послеоперационного шва и развития осложнений после КС, остается открытой. Отсутствуют обоснованные микробиологические факторы риска развития инфекции хирургической акушерской раны, позволяющие прогнозировать присоединение послеоперационных осложнений и оценивать степень их тяжести. Определение значимого видового состава микробиоты урогенитального тракта женщин в развитии послеоперационных осложнений, в т.ч. инфекции хирургической акушерской раны после КС, является приоритетной задачей при формировании тактики быстрого реагирования по назначению эффективных антимикробных препаратов.

### Информация о финансировании

Работа поддержана грантом Российского научного фонда «УМНИК» №16-15-10314. Заявка (У-80953), договор №N17994ГУ/2022 от 30.05.2022.

### Financial support

The work was supported by a grant from the Russian Science Foundation “UMNIK” No 16-15-10314. Application (U-80953), contract No N17994GU/2022 dated 05/30/2022.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

### Литература

- Савельева ГМ, Караганова ЕЯ. Кесарево сечение. Акушерство и гинекология: Новости. Мнения. Обучения. 2015;1(2):23-29.
- Торобаева МД, Рыскельдиева ВР. Современный взгляд на профилактику послеродовых гнойно-септических осложнений. Научные исследования. 2017;1(12):19-23.
- Мухлынина ИА, Тен АР, Якушев АМ. Инфекционные осложнения кесарева сечения. Междисциплинарные исследования: опыт прошлого, возможности настоящего, стратегии будущего. 2021;4:29-35.
- Белокриницкая ТЕ, Фролова НИ. Профилактика септических осложнений в акушерстве: рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации и Всемирной организации здравоохранения, 2015 г. Российский вестник акушера-гинеколога. 2016;16(3):79-84.
- Егорова АТ, Глебова ТК, Моисеенко ДА. Гнойно-воспалительные осложнения в акушерской практике (по материалам краевой клинической больницы г. Красноярск). Сибирское медицинское обозрение. 2015;4:94-97.
- Soper DE. 18 Genitourinary Infections and Sexually Transmitted Diseases. In: Berek JS, Novak E. Berek and Novak's Gynecology. 15th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2012; 557-574.
- Краснопольский ВИ, Логутова ЛС, Буянова СН, Чечнева МА, Ахледидиани КН. Результаты оперативной активности в современном акушерстве. Журнал акушерства и женских болезней. 2015;64(2):53-58.
- Бычков ИВ, Шамарин СВ, Бычков ВИ. Состояние фетоплацентарной системы у женщин с неполноценным рубцом на матке. Детская медицина Северо-Запада. 2011;2(3):10-12.
- Пестрикова ТЮ, Юрасова ЕА, Котельникова АВ, Стрельникова НВ, Воронова ЮВ. Клинико-лабораторная оценка эффективности персонализированного подхода в лечении бактериального вагиноза и его сочетания с вульвовагинальным кандидозом. Акушерство и гинекология. 2020;3:198-202. DOI: 10.18565/aig.2020.3.198-202

10. Самойлова ТЕ, Кохно НИ, Докудаева ША. Микробные ассоциации при послеродовом эндометрите. Медицинское обозрение. 2018;2(10):6-13.
11. Рыскельдиева ВТ, Сапарбаев АС. К вопросу о прогнозировании послеродового эндометрита у женщин после кесарева сечения в Кыргызстане. Российский вестник акушера-гинеколога. 2013;3(1):59-61.
12. Рыжков ВВ, Хажбиев АА. Профилактика гнойно-септических осложнений после операции кесарева сечения. Таврический медико-биологический вестник. 2017;2(2):190-196.
13. Коробков НА. Неклостридиальная анаэробная инфекция I этапа септических послеродовых осложнений. Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова. 2013;2(20):80-82.
14. Курцер МА, Котомина ТС, Подтетев АД. Эмпирическая антибактериальная терапия послеродового эндометрита. Российский медицинский журнал. 2016;22(5):242-246. DOI 10.18821/0869-2106-2016-22-5-242-246
15. Смирнова СС, Егоров ИА, Голубкова АА. Гнойно-септические инфекции у родильниц. Часть 2. Клинико-патогенетическая характеристика нозологических форм, этиология и антибиотикорезистентность (обзор литературы). Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2022;99(2):244-259. DOI: 10.36233/0372-9311-227
8. Bychkov IV, Shamarin SV, Bychkov VI. Sostoyanie fetoplatsentarnoi sistemy u zhenshchin s nepolnotsennym rubtsom na matke. Detskaya meditsina Severo-Zapada. 2011;2(3):10-12. (In Russian).
9. Pestrikova TYu, Yurasova EA, Kotelnikova AV, Strelnikova NV, Voronova YuV. Clinical and laboratory evaluation of the effectiveness of a personalized approach in the treatment of bacterial vaginosis and its combination with vulvovaginal candidiasis. Akusherstvo i ginekologiya. 2020;3:198-202. (In Russian).
10. Samoilova TE, Kokhno NI, Dokudaeva ShA. Microbial associations in postpartum endometritis. RMJ. Medical Review. 2018;10:6-13. (In Russian).
11. Ryskel'dieva VT, Saparbaev AS. K voprosu o prognozirovanii poslerodovogo endometririta u zhenshchin posle kesareva secheniya v Kyrgyzstane. Rossiiskii vestnik akushera-ginekologa. 2013;3(1):59-61. (In Russian).
12. Ryzhkov VV, Khazhbiev AA. Prevention of purulent-septic complications after caesarean section. Tavricheskii mediko-biologicheskii vestnik. 2017;2(2):190-196. (In Russian).
13. Korobkov NA. Neklostridial'naya anaerobnaya infektsiya I etapa septicheskikh poslerodovykh oslozhenii. Uchenye zapiski SPbGMU im. akad. I.P.Pavlova. 2013;2(20):80-82. (In Russian).
14. Kurtser TS, Kotomina TS, Podtetenev AD. The empiric antibacterial therapy of postpartum endometritis. Rossiiskii meditsinskii zhurnal (Medical Journal of the Russian Federation, Russian journal). 2016;22(5):242-246. DOI 10.18821/0869-2106-2016-22-5-242-246 (In Russian).
15. Smirnova SS, Egorov IA, Golubkova AA. Purulent-septic infections in puerperas. Part 2. Clinical and pathogenetic characteristics of nosological forms, etiology and antibiotic resistance (literature review). Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii (Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology). 2022;99(2):244-259. DOI: 10.36233/0372-9311-227 (In Russian).

## References

### Информация о соавторах:

Коломбет Любовь Васильевна, доктор биологических наук, заведующая научной частью, ученый секретарь ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Богачева Наталья Викторовна, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет»

### Information about co-authors:

Lyubov V. Kolombet, PhD, DSc in Biological Sciences, Head of Science Department, Scientific Secretary of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Natalya V. Bogacheva, MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Microbiology and Virology of the Kirov State Medical University

## Памяти Игоря Георгиевича Шемякина (13 февраля 1957 г. – 19 марта 2024 г.)

**19** марта 2024 г. скоропостижно скончался доктор биологических наук, профессор, заместитель директора ФБУН ГНЦ ПМБ по научной работе Игорь Георгиевич Шемякин.

Игорь Георгиевич родился 13 февраля 1957 г. в Грозном. После окончания школы поступил в Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова на биологический факультет, который окончил в 1979 г. В том же году поступил на работу во ВНИИ ПМ и был направлен в целевую аспирантуру. По окончании аспирантуры в 1983 г. И.Г.Шемякин возвращается во ВНИИ ПМ, в котором последовательно занимает должности начиная с младшего научного сотрудника до начальника отдела.

После образования в 2006 г. Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии Игорь Георгиевич вступает в должность заведующего лабораторией молекулярной биологии, а в 2008 г. назначается на должность заместителя директора по научной работе.

Игорь Георгиевич Шемякин внес заметный вклад в развитие таких научных направлений, как геносистематика клинических штаммов возбудителя туберкулеза, технологии обнаружения и нейтрализации опасных инфекций и природных биотоксинов на основе моно- и поликлональных антител, методы иммунодетекции, ПЦР-амплификации и ДНК-аптамеров, иммунодиагностика инфекционных болезней, разработка конъюгированной вакцины нового поколения для обеспечения высокоэффективной профилактики брюшнотифозной инфекции, создание новой технологической платформы для получения нативных человеческих терапевтических моноклональных антител.

С 2019 г. И.Г.Шемякин был заместителем руководителя «Центра геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической не-



зависимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий» и руководителем профильной секции экспертной комиссии при президиуме Совета по реализации Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 гг. по направлению «Биобезопасность и обеспечение технологической независимости».

В течение ряда лет И.Г.Шемякин успешно руководил несколькими международными проектами, главным образом в области изучения туберкулезной инфекции.

И.Г.Шемякин имел научные степени кандидата биологических наук (1986 г.) и

доктора биологических наук (2005 г.), а также звание профессора.

Игорь Георгиевич – автор более 200 научных работ в российских и зарубежных изданиях, нескольких монографий, 40 патентов и авторских свидетельств на изобретение; под его руководством защищены 10 диссертаций на соискание степени кандидата наук.

Игорь Георгиевич был членом диссертационных советов ГНЦ ПМБ и МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского, возглавлял экспертную комиссию ГНЦ ПМБ, был членом редколлегии журнала «Бактериология»

Игорь Георгиевич Шемякин был принципиальным, авторитетным и уважаемым ученым и руководителем. Коллеги по работе глубоко скорбят по поводу его кончины.

*Редакционный совет  
и редакционная коллегия журнала «Бактериология»,  
а также коллектив Издательства «Династия»  
выражают искренние  
соболезнования родным и близким  
Игоря Георгиевича Шемякина.*

# 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](mailto:info@obolensk.org) или [bacteriology@obolensk.org](mailto:bacteriology@obolensk.org). В теме сообщения следует указать «Бактериология».

### Требования к оформлению статьи.

*Экспериментальная статья* должна состоять из разделов: введение, материалы и методы, результаты и обсуждение, список литературы.

Рукопись должна быть подготовлена в текстовом редакторе MS Word, шрифт – Times New Roman, размер – 14, межстрочный интервал – 1,5, поля – 2 см. Статья должна включать резюме и ключевые слова на русском и английском языках. Нумерация всех страниц рукописи сквозная.

*Краткие сообщения* представляются без таблиц и рисунков.

Статья должна быть подписана всеми авторами, включая иностранных.

К статье следует приложить сведения об авторах на русском и английском языках с указанием адреса, контактных телефонов (служебного и мобильного), факса и электронной почты с указанием автора, ответственного за переписку с редакцией.

Заглавие статьи оформляется следующим образом:

#### НАЗВАНИЕ СТАТЬИ

И. И. Иванов\*, П. П. Петров\*\*

\*Первая организация, г. Москва, РФ

\*\*Вторая организация, Техас, США

E-mail

[далее текст аннотации и ключевые слова]

Текст статьи, включая резюме, список литературы, подписи к рисункам и таблицы, должны быть оформлены одним файлом, а каждый рисунок – отдельным файлом.

РЕЗЮМЕ статьи должно быть представлено на русском и английском языках, отражать основные полученные результаты и содержать не более 250 слов.

КЛЮЧЕВЫХ СЛОВ (словосочетаний) должно быть не более 10, на русском и английском языках.

Во ВВЕДЕНИИ (без заголовка) следует изложить мотивацию написания данной работы и отдельным абзацем обозначить цель исследования. Дополнительно на английском языке.

Раздел МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ должен содержать сведения об объекте исследования (включая источник получения, название коллекции) и краткое описание использованных методик, позволяющее их воспроизвести (на ранее опубликованные и общеизвестные методы дается ссылка); для приборов и реактивов указываются название фирмы на языке оригинала в кавычках и страны в скобках.

Следует использовать общепринятые современные сокращения мер, физических, химических и математических величин, терминов и т.д. Единицы измерения должны даваться в единицах СИ (Система Интернациональная). Обозначения мутантных и рекомбинантных форм микроорганизмов следует приводить в соответствии с международными правилами. Для трехбуквенного обозначения генов бактерий используются строчные буквы (курсив).

Рисунки и таблицы размещаются в тексте статьи в соответствии с пожеланиями авторов. Кроме того, черно-белые и цветные рисунки (в формате \*.jpg) прилагаются к статье в виде отдельных файлов (ris1.jpg, ris2.jpg и т.д.)

Сведения о финансовой поддержке работы приводятся в конце текста статьи перед списком литературы.

В СПИСКЕ ЛИТЕРАТУРЫ указываются авторы, название статьи, название журнала или сборника, год, номер, страницы. Для названия журналов используются общепринятые сокращения (<http://www.nlm.nih.gov/>).

В случае невыполнения настоящих правил оформления статья не принимается и отсылается авторам на доработку.

Редакция оставляет за собой право редактировать статьи по согласованию с автором.

Присланные в редакцию статьи проходят процедуру рецензирования. В случае отклонения статьи редакция направляет автору мотивированный отказ.

Публикация – бесплатная.

**Статьи направлять по адресу:**  
**142279, Московская обл.,**  
**Серпуховский р-н, п. Оболенск, ГНЦ ПМБ**  
**Тел. (4967) 36-00-46**  
**Факс (4967) 36-00-10**  
**E-mail: [info@obolensk.org](mailto:info@obolensk.org)**  
**или**  
**[bacteriology@obolensk.org](mailto:bacteriology@obolensk.org)**