

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2025 • ТОМ 10 • №3

ISSN 2500-1027

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Научно - практический журнал

Главный редактор

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

Ответственный секретарь

И.Г.Говорунов, к.б.н.
(Россия)

Редакционный совет

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

Редколлегия

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

Учредитель

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

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

Адрес учредителя и редакции:

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

Телефон: +7-4967-360003

+7-4967-360046

Факс: +7-4967-360010

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

Издатель

© «Издательство «Династия»



www.phdynasty.ru

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

Подписано в печать 30.09.2025

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 1440 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

- Возможные риски использования искусственного интеллекта / машинного обучения
и автоматизированных экспериментов в области технологий, значимых для биологической безопасности **5**

Экспериментальные статьи

- Мышиная модель летального сепсиса, вызываемого *Acinetobacter baumannii*
А.И.Борзилов, О.В.Коробова, Т.И.Комбарова, Е.С.Перескокова, Е.А.Ганина, А.В.Попова. **8**
- Выбор антибактериальной терапии у детей с инфекциями мочевыводящих путей
после аллогенной трансплантации трупной почки
А.В.Мартыненко, Н.И.Фёдорова, Е.А.Молчанова, Д.Б.Эктов, Р.Р.Галимов,
Я.В.Панасюк, Н.В.Власенко, Н.В.Сычева, А.В.Тутельян, С.Н.Кузин **19**
- Влияние pH-стресса на спектры жирных кислот штаммов *Vibrio cholerae*
Е.С.Шипко, О.В.Дуванова, Р.В.Писанов, В.Д.Кругликов **26**
- Опыт проведения полногеномного секвенирования штаммов чумного микроба
в полевых условиях за пределами Российской Федерации (Монголия)
Г.Х.Базарова, Е.Е.Бжитских, А.А.Киреев, А.А.Оплеухин, А.Ю.Югушев, Е.Н.Рождественский **33**
- Особенности изменений микробного пейзажа возбудителей гнойно-септических инфекций
и их чувствительности к антимикробным препаратам во всех отделениях многопрофильного
детского стационара за период 2017–2023 гг.
Ю.Г.Дьячкова **37**
- Характеристика литического фага Ph_15, активного в отношении биопленок *Pseudomonas aeruginosa*
Н.В.Колупаева, В.В.Кузин, О.А.Щербакова, Л.В.Колупаева, О.В.Калмантаева,
Н.А.Сухаричева, Н.С.Грищенко, Т.И.Рудницкая, Е.С.Кузина **42**
- Позатканное выделение внеклеточной и геномной ДНК на примере микобактерий
А.В.Ильинов, А.Г.Савицкая, О.Е.Хохлова, Ю.С.Винник, О.В.Теплякова. **51**
- Способность медленно растущих и быстро растущих штаммов бактерий рода *Mycobacterium*
взаимодействовать с чужеродной внеклеточной ДНК
А.В.Ильинов, А.Г.Савицкая, О.Е.Хохлова, Ю.С.Винник, О.В.Теплякова. **56**
- Оценка эффективности применения ДагХром Клебсиелла агара
Р.Ю.Юнусова, В.Г.Горелова, Е.А.Воропаева, Е.И.Лиханская, Т.А.Скирда, А.М.Бичучер,
И.Г.Мартыненко, И.А.Полилова, А.В.Мещерякова, М.И.Глухова, С.Ю.Комбарова. **62**
- Внутривидовая вариабельность вирулентных свойств *Burkholderia thailandensis*
А.Ю.Замарина, М.В.Бартенева, И.А.Хабарова, С.И.Жукова,
Н.Г.Плеханова, А.Д.Викторов, И.Б.Захарова **71**

Обзоры

- Многоуровневая взаимосвязь микробиома кишечника
с коморбидным фоном у женщин в период менопаузы
Н.В.Богачева, М.Л.Смертина, Е.Е.Корнеева **77**
- Микробиом кожи и его клиническое значение
А.М.Морозов, А.Н.Сергеев, Ю.В.Червинец, М.Е.Пискарева **83**
- Транскриптомный анализ для изучения механизмов антибиотикорезистентности
и вирулентности *Klebsiella pneumoniae*
А.Е.Соломенцева, С.В.Губанов, М.В.Фурсов, Н.К.Фурсова **90**
- Правила оформления статей (основные положения) **101**

BACTERIOLOGY

Scientific and Practical Journal

Editor-in-Chief

I.A.Dyatlov, academician of RAS, Sc.D., prof.
(Russia)

Executive Secretary

I.G.Govorunov, PhD
(Russia)

Editorial Council

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

Editorial Board

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

Founder and Publisher

© State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Abstracting journal is indexed in the Russian Science Citation Index

Editorial Office:

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

Publisher

© «Dynasty» Publishing House



www.phdynasty.ru

Advertising Department:

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

Editor-in-Chief's Introduction

Potential risks of using artificial intelligence / machine learning and automated experiments in the field of technologies relevant to biosafety	5
--	---

Experimental Articles

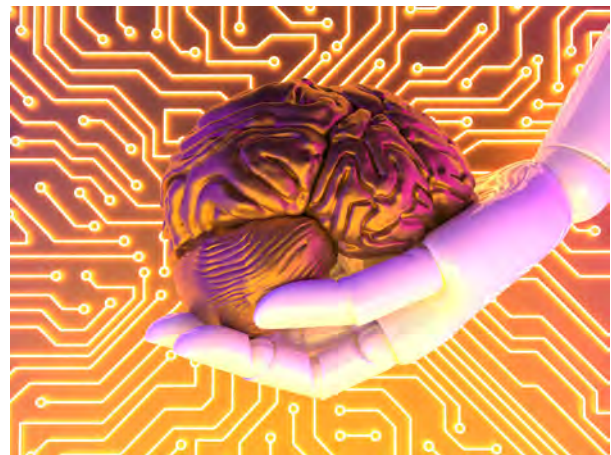
Mouse model of lethal sepsis caused by <i>Acinetobacter baumannii</i> A.I.Borzilov, O.V.Korobova, T.I.Kombarova, E.S.Pereskokova, E.A.Ganina, A.V.Popova	8
Selection of antibacterial therapy in children with urinary tract infections after allogeneic cadaveric kidney transplantation A.V.Martynenkova, N.I.Fedorova, E.A.Molchanova, D.B.Ektov, R.R.Galimov, Ya.V.Panasjuk, N.V.Vlasenko, N.V.Sycheva, A.V.Tutelyan, S.N.Kuzin	19
The effect of pH stress on the fatty acid spectra of <i>Vibrio cholerae</i> strains E.S.Shipko, O.V.Duvanova, R.V.Pisanov, V.D.Kruglikov	26
Experience of conducting whole genome sequencing of plague microbes strains in field conditions outside the Russian Federation (Mongolia) G.Kh.Bazarova, E.E.Bzhitskikh, A.A.Kireev, A.A.Opleukhin, A.Yu.Yugushev, E.N.Rozhdestvensky	33
Features of changes in the microbial landscape of pathogens causing purulent-septic infections and their sensitivity to antimicrobial drugs in all departments of a children's hospital for the period 2017–2023 Yu.G.Dyachkova	37
Study of phage and disinfectants combination combined for the destruction of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilms N.V.Kolupaeva, V.V.Kuzin, O.A.Shcherbakova, L.V.Kolupaeva, O.V.Kalmantaeva, N.A.Sukharicheva, N.S.Grishchenko, T.I.Rudnitskaya, E.S.Kuzina	42
Step-by-step isolation of extracellular genomic DNA of mycobacteria A.V.Ilinov, A.G.Savitskaya, O.E.Khokhlova, Yu.S.Vinnik, O.V.Tepliyakova	51
The ability of slow-growing and fast-growing strains of <i>Mycobacterium</i> to interact with foreign extracellular DNA (eDNA) A.V.Ilinov, A.G.Savitskay, O.E.Khokhlova, Yu.S.Vinnik, O.V.Tepliyakova	56
The prospects of using <i>Klebsiella</i> chrom agar in modern practical microbiology R.Yu.Yunusova, V.G.Gorelova, E.A.Voropaeva, E.I.Likhanskaya, T.A.Skirda, A.M.Bichucher, I.G.Martynenko, I.A.Polilova, A.V.Meshcheryakova, M.I.Glukhova, S.Yu.Kombarova	62
Intraspecific variability of virulence properties <i>Burkholderia thailandensis</i> A.Yu.Zamarina, M.V.Barteneva, I.A.Khabarova, S.I.Zhukova, N.G.Plekhanova, A.D.Victorov, I.B.Zakharova	71

Reviews

Multilevel relationship between gut microbiome and comorbid background in menopausal women N.V.Bogacheva, M.L.Smertina, E.E.Korneeva	77
The skin microbiome and its clinical significance A.M.Morozov, A.N.Sergeev, Yu.V.Chervinets, M.E.Piskareva	83
Transcriptome analysis to study the mechanisms of antibiotic resistance and virulence of <i>Klebsiella pneumoniae</i> A.E.Solomentseva, S.V.Gubanov, M.V.Fursov, N.K.Fursova	90
Instructions for Authors	101

Возможные риски использования искусственного интеллекта / машинного обучения и автоматизированных экспериментов в области технологий, значимых для биологической безопасности

Хорошо известно, что использование искусственного интеллекта (ИИ) значительно сокращает время разработки различных биотехнологических продуктов за счет быстрой обработки объемных баз данных и предсказания на их основе результатов исследований. Вместе с тем доступность ИИ и алгоритмов машинного обучения для множества людей несет в себе риски использования данных технологий в злонамеренных целях. Прежде всего это касается оптимизации синтеза рекомбинантных белков, т.е. направления, достаточно хорошо разработанного и применяемого для создания средств специфической профилактики (вакцин, иммуноглобулинов, моноклональных антител), терапевтических препаратов и диагностических средств.



Для создания высокоточных диагностических средств, предназначенных для выявления биологических угроз, с успехом используется машинное обучение, которое позволяет идентифицировать новые мишени у патогенов и в ускоренном режиме создавать средства индикации. Это значимый процесс для повышения эффективности диагностической деятельности в целом, позволяющий в короткие сроки принимать решение о методах купирования вспышек или эпидемических проявлений, а также быстро выявлять эксцессы, связанные с биологическим терроризмом.

Эффективность создания рекомбинантных белков с различными свойствами для терапевтических или профилактических целей также связана с ИИ и машинным обучением, но имеет и свои риски. Доступность информации о структуре белков и генах токсических продуктов биологического происхождения позволяет в достаточно короткие сроки создавать генно-инженерными методами продуценты данных компонентов, как нативных, так и с измененными свойствами, что существенно затрудняет выявление и идентификацию новых опасных агентов. В этом случае использование ИИ и машинного обучения будет эффективным инструментом несанкционированных разработок. Опыт нашего института в области создания рекомбинантных токсинов в различных вариантах (нативного токсина или анатоксина) показывает, что такие разработки могут быть осуществлены в короткое время при достаточном уровне квалификации генных инженеров и соответствующем оснащении лаборатории. Так, сложная структура, например токсина змеи, может быть воспроизведена в продуценте на основе кишечной палочки в течении 1–2 мес. При современном использовании ИИ и машинного обучения такой процесс может быть значительно ускорен.

Говоря о применении ИИ в борьбе с биотерроризмом и эффективном выявлении соответствующих угроз для предотвращения эксцессов, нужно обратить внимание на следующие уже устоявшиеся тенденции в данной области. ИИ позволяет быстро обрабатывать и анализировать большие объемы данных, выявлять признаки террори-

стической активности и потенциальных биологических угроз, что позволяет своевременно принимать меры противодействия. Это помогает службам безопасности оперативно реагировать на происходящие события. Повсеместное внедрение систем видеонаблюдения с ИИ-анализом позволяет в реальном времени сканировать объекты на предмет подозрительных агентов, например оружия или опасных биологических веществ, при обнаружении которых система оповещает соответствующие инстанции.

Еще одним направлением использования ИИ в области биобезопасности является внедрение системы мер противодействия пропаганде и вербовке в интернет-пространстве, когда выявляется и анализируется экстремистский контент, что дает возможность определять механизмы вербовки через социальные сети и мессенджеры. Выявление случаев вербовки или шантажа сотрудников учреждений, работающих с опасными патогенами и обладающими высокими компетенциями в области генной инженерии, является чрезвычайно актуальной задачей, и возможности использования ИИ в данной сфере только предстоит оценить и внедрить в практику противодействия радикальным группам. Прогнозирование и предотвращение атак с использованием данных о поведении, активности и социальной среде потенциальных террористов, ИИ помогает предсказывать вероятность несанкционированных биотехнологических разработок, а также совершения биотеррористических актов. Инструменты ИИ также могут использоваться для прогнозирования технологического прорыва вероятных противников и создания новых биотехнологических решений для выполнения задач и удовлетворения оперативных потребностей.

Одним из направлений внедрения ИИ в области биобезопасности является разработка норм и законов, которые регулируют использование ИИ в целях уменьшения рисков нарушения прав человека и предотвращения возможного злоупотребления технологиями. Существующая нормативно-правовая база не учитывает такие аспекты использования ИИ в научных разработках, как: оценка потенциальных биологических и технических рисков, связанных с использованием ИИ, включая возможное создание токсичных или патогенных молекул, ошибки в обработке результатов и заключениях; алгоритмы проведения лабораторного и клинического тестирования новых белков, спроектированных ИИ, для оценки их безопасности и функциональности перед внедрением в практику; регламентация использования ИИ, включая мониторинг и документооборот, обеспечение прослеживаемости анализируемых данных и решений ИИ с обеспечением прозрачности алгоритмов, тестирование на безопасность и функциональность, аудит и ограничение доступа к ИИ-системам; обеспечение информационной безопасности, в частности защита данных и алгоритмов ИИ от несанкционированного доступа и манипуляций; формирование механизма соблюдения этических норм при использовании ИИ и машинного обучения, ответственность за нарушения, защита данных и прав личности.

Несмотря на необходимость совершенствования нормативно-правовой базы в области ИИ в целом и в отношении его использования в научных разработках, формирование конкретных предложений по этому направлению требует решения вопроса о правосубъектности ИИ, возникающего из следующего правового противоречия: ИИ, обладая таким свойственным субъекту права свойством, как свобода принятия решений, выступает объектом права, к которому не применимы такие механизмы правового регулирования, как уполномочивание, обязательные процедуры и аспекты разрешительной системы. Без решения вопроса о правосубъектности, позволяющего однозначно трактовать применимость механизмов реализации права к разработчикам ИИ, пользователям ИИ и собственно ИИ и распределения между ними ответственности за действия или бездействие ИИ и прав на результаты его деятельности, решение частных вопросов изменения действующего законодательства в этой области не представляется возможным. Это большое поле деятельности не только для специалистов в биобезопасности и биотехнологии, но и юристов-правоведов. Основные подходы к решению таких задач только предстоит разработать.

В настоящее время в мировой литературе интенсивно обсуждаются вопросы пересечения «искусственного интеллекта» и «науки», что является ключевым моментом в понимании места ИИ в современной исследовательской деятельности. Разделение может происходить по следующей схеме: ИИ подразумевает автоматизацию вычислительных задач, в то время как наука использует человеческое познание. В биологиче-

ских исследованиях и разработках инструменты биологического проектирования направлены на прогнозирование молекулярных структур, создание новых молекул и помощь в разработке метаболических путей, а также на выполнение других подобных функций. Однако, несмотря на уже имеющиеся успехи, ИИ и машинное обучение не могут в ближайшей перспективе заменить научный метод поиска достоверных результатов путем многократных наблюдений, выдвижения гипотез и планирования экспериментов. Биотехнология в современном мире интенсивно развивается, что связано с реальными и прогнозируемыми биологическими угрозами, кризисами и экцессами в области здравоохранения и экологическими проблемами, однако для широкого использования получаемых данных о новых технологиях следует решить ряд важных вопросов, связанных с балансом между открытостью и безопасностью, особенно в контексте «трансдисциплинарной биотехнологии» (вновь сформированный термин для данной области), результаты которой могут быть использованы в злонамеренных целях.

Следует также обратить внимание еще на одну сферу использования ИИ в научной деятельности и, в частности, в области биотехнологических разработок. Это написание или формирование научных статей и отчетов, которые в дальнейшем подвергаются рецензированию квалифицированными экспертами. Как показывает практика, формирование научных статей с использованием ИИ может нести в себе риски некачественного или недостоверного анализа существующих материалов по данной теме, неверной интерпретации экспериментов или ошибок при их планировании. ИИ может в некоторых случаях «додумывать» некоторые результаты, аппроксимировать их, ссылаться на несуществующие статьи и т.п. (это из личной практики сотрудников ГНЦ ПМБ по использованию ИИ). Заметить, например эксперту РАН, эксперту научного журнала или гранта, невооруженным взглядом такие «инновации» достаточно сложно, так как в данном случае необходимо проводить не только экспертизу на наличие плагиата, но и поиск недобросовестной информации, что потребует дополнительных инструментов для анализа и времени.

В недалеком будущем биотехнологические процессы будут включать в себя элементы автоматизации и ИИ / машинного обучения, которые будут взаимодействовать с традиционными экспериментальными лабораторными системами для повышения эффективности исследований, разработки и масштабирования технологий. Уже сейчас существуют технологии, использующие биореакторы с облачным компонентом, позволяющие осуществлять долгосрочный мониторинг поведения культур, облегчают сбор, анализ данных, давая возможность оптимального управления биопроцессами.

Таким образом, совершенствование и внедрение ИИ / машинного обучения в биотехнологические процессы является неизбежным и будет только нарастать, а также будет нарастать спектр рисков автономного использования таких систем, что следует учитывать при их практическом использовании в исследовательской и производственной деятельности.

Главный редактор, академик РАН И.А.Дятлов

Мышиная модель летального сепсиса, вызываемого *Acinetobacter baumannii*

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

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

В ходе исследований была разработана модель летальной септической инфекции у мышей, вызываемой клинически-ми штаммами *Acinetobacter baumannii* капсульных типов K9 и K27 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск». Внутривентриальное введение мышам линии BALB/c бактериальных культур в дозе 40 ЛД₅₀ с муцином вызывает быстрое развитие сепсиса. В результате у мышей через 1,5 ч происходит генерализация ацинетобактерной инфекции, которая приводит к гибели 100% животных в течение суток. В первые 12 ч после инфицирования у лабораторных животных наблюдаются отклонения от нормы некоторых гематологических и биохимических показателей крови. В печени и лимфоидных органах животных наблюдаются различного рода патологические изменения.

Пригодность разработанных моделей ацинетобактерной инфекции была проверена в экспериментах по ее лечению. Ампициллин/сульбактам и специфичные бактериофаги AM24 и AS12 показали хороший терапевтический эффект. Антибиотик давали животным дважды в сутки в количестве 200/100 мг/кг в течение 5 дней или однократно. Фаги назначали однократно в количестве 10⁹ БОЕ в режимах профилактики, раннего и позднего лечения. Профилактика и раннее лечение обеспечивали 100%-ю выживаемость зараженных животных и полную санацию их организма от бактерий *A. baumannii*. Более поздние фаготерапия и антибиотикотерапия ухудшают прогноз лечения.

Ключевые слова: *Acinetobacter baumannii*, ацинетобактерная инфекция, мышиная модель, сепсис, антибиотикотерапия, фаготерапия

Для цитирования: Борзилов А.И., Коробова О.В., Комбарова Т.И., Перескокова Е.С., Ганина Е.А., Попова А.В. Мышиная модель летального сепсиса, вызываемого *Acinetobacter baumannii*. Бактериология. 2025; 10(3): 8–18. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-8-18

Mouse model of lethal sepsis caused by *Acinetobacter baumannii*

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

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

During the research, a model of lethal septic infection in mice was developed, caused by two clinical strains of *Acinetobacter baumannii* capsular types K9 and K27 from the State Collection of Pathogenic Microorganisms "GKPM-Obolensk". Intraperitoneal injection of bacterial cultures into BALB/c mice at a dose of 40 LD₅₀ with mucin causes the rapid development of sepsis. As a result, in mice, after 1.5 hours, generalization of acinetobacter infection occurs, which leads to the death of 100% of the animals within 24 hours after infection. In the first 12 hours after infection, laboratory animals show deviations from the norm in some hematological and biochemical blood parameters. Different pathological changes were observing in the liver and lymphoid organs.

The mouse *Acinetobacter*-associated infection model was validated in experiments on treatment. Ampicillin/sulbactam and the specific lytic bacteriophages AM24 and AS12 provide a good therapeutic effect. The antibiotic was given to the animals daily in the amount of 200/100 mg/kg for 5 days and once. Phages were administered intraperitoneally once in the amount of 10⁹ PFU in the prophylaxis, early and late treatment modes. The prophylaxis and early treatment ensured 100% survival among infected animals and complete clearance of their bodies from *A. baumannii* bacteria. Later phage and antibiotic therapy worsen the treatment prognosis.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, acinetobacter infection, mouse model, sepsis, antibiotic therapy, phage therapy

For citation: Borzhilov A.I., Korobova O.V., Kombarova T.I., Pereskokova E.S., Ganina E.A., Popova A.V. Mouse model of lethal sepsis caused by *Acinetobacter baumannii*. Bacteriology. 2025; 10(3): 8–18. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-8-18

Для корреспонденции:

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

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0147

Статья поступила 24.03.2025, принята к печати 30.09.2025

For correspondence:

Alexander I. Borzhilov, PhD, MD, Leading Researcher of the laboratory of biological tests of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0147

The article was received 24.03.2025, accepted for publication 30.09.2025

Род *Acinetobacter* включает в себя грамотрицательные аэробные неферментирующие бактерии, обычно встречающиеся в почве и окружающей среде, которые могут вызывать оппортунистические инфекции у пациентов в отделениях интенсивной терапии и людей с ослабленным иммунитетом [1, 2]. Ацинетобактерии не имеют жгутиков, некоторые штаммы могут продуцировать капсулу, бледно-желтый и светло-серый пигменты [3].

Наиболее распространенным патогеном этого рода является *Acinetobacter baumannii* [1, 2]. Этот вид считается одним из самых серьезных внутрибольничных патогенов в мире [4, 5]. Ацинетобактерии способны к длительному выживанию в неблагоприятных условиях, в т.ч. на предметах, таких как больничные кровати, дверные ручки и медицинское оборудование, что приводит к опосредованной передаче от пациента к пациенту [6]. Этот микроорганизм привлекает все большее внимание как условно-патогенный, вызывающий широкий спектр госпитальных инфекций у людей со сниженным иммунитетом. Он может вызывать опасные для жизни заболевания: пневмонию, эндокардит, менингит, инфекции мочевыводящих путей и ожоговых ран. Заболевания, вызываемые *A. baumannii*, имеют неблагоприятный прогноз с высокой смертностью [7, 8]. Летальность от этой инфекции достигает 54% [3, 9].

Вирулентность *A. baumannii* связывают с наличием капсульного полисахарида К, липида А, аминопептидазы, уреазы и кислой фосфатазы [10–12]. Ацинетобактерии сохраняют свою жизнеспособность внутри макрофагов и в альвеолярных эпителиальных клетках. Установлено, что клинические штаммы ацинетобактерий способны формировать биопленки, способствующие устойчивости к действию антибактериальных препаратов [13–15].

Как правило, *A. baumannii* вызывают клинические формы инфекции у тяжелобольных людей, получающих лучевую, гормональную, цитостатическую терапию, причем наибольшему риску подвергаются пациенты, находящиеся в отделении интенсивной терапии и при длительном пребывании в стационаре [3, 16, 17]. Ацинетобактер является одним из наиболее устойчивых к антибиотикам возбудителей в клинической медицине [18]. Лечение осложняется устойчивостью *A. baumannii* к большому количеству противомикробных препаратов, включая карбапенемы, аминогликозиды, тетрациклины, фторхинолоны и β -лактамы [7, 8]. Он имеет природную устойчивость к цефалоспорином I и II поколений, природным аминопенициллинам, ко-тримоксазолу, фосфомицину, азтреонаму [19]. По некоторым данным, штаммы с множественной лекарственной устойчивостью вызывают до 80% случаев пневмонии [20].

Всемирная организация здравоохранения отнесла *A. baumannii* к числу наиболее значимых патогенов в связи с острой необходимостью разработки новых противомикробных средств [21]. Для лечения инфекции, вызванной *A. baumannii*, наиболее часто используют ампициллин/сульбактам, цефоперазон/сульбактам, имипенем, меропенем и дорипенем [19, 22]. Появление устойчивых к лекарствам бактерий стимулирует исследования противомикробных альтернатив. Бактериофаги и их литические ферменты (лизины) являются наиболее перспективными средствами для борьбы с лекарственно-устойчивыми штаммами *A. baumannii* [23–30].

Исследователи используют различные животные модели инфекции, вызываемой бактериями *A. baumannii*. Для оценки *in vivo* активности антибактериальных препаратов и исследования патогенеза ацинетобактерной инфекции наиболее часто применяют мышиную модель. Для этих целей используют, как правило, инбредных животных. Так, например, на мышах линии C57BL/6 в возрасте 6–8 нед. изучали факторы вирулентности штаммов *A. baumannii*. Авторы моделировали летальный ацинетобактерный сепсис, заражая мышей внутрибрюшинно различными клиническими изолятами. При этом в случае введения ацинетобактерий в раствор муцина вирулентность штаммов повышалась на два порядка и составляла 10^3 – 10^4 КОЕ [31].

Здоровые мыши линий BALB/c и C57BL/6 малочувствительны к ацинетобактерной инфекции. Однако имеются работы, в которых здоровых мышей применяют для изучения патогенеза ацинетобактерной инфекции, вызывая у них летальную и сублетальную септицемию внутрибрюшинной инъекцией культуры клинического изолята *A. baumannii* LAC-4 [32].

Нередко септическую мышиную модель используют для оценки антибактериальной активности лекарственных препаратов. Например, эффективность меропенема в сочетании с сульбактамом исследователи оценивали на мышах BALB/c (5–6 нед.). В этом случае генерализованную инфекцию вызывали внутрибрюшинным введением штамма с множественной лекарственной устойчивостью *A. baumannii* Ab-153 в дозе $2,1 \cdot 10^7$ – $2,6 \cdot 10^7$ КОЕ [33].

Для воспроизведения генерализованной инфекции используют и внутривенное введение авирулентного штамма ATCC 19606 *A. baumannii*. Введение инбредным нокаутным мышам C57BL/6 klotho KO культуры ацинетобактерий в дозе 10^8 КОЕ приводило к гибели 57% животных в течение 7 дней. Важно отметить, что возрастные мыши были более чувствительными к ацинетобактерной инфекции, чем молодые животные [34].

Мышей линии BALB/c также используют для воспроизведения ацинетобактерного сепсиса. Так, например, Altamirano et al. заражали самок мышей BALB/c (6–10 нед.) внутрибрюшинно культурами ацинетобактера в дозе 10^6 КОЕ с 6%-м муцином для изучения поведения фагоустойчивых мутантов *in vivo*. Данная модель сепсиса была не летальной, а использовалась для пассирования культур в организме мышей. Через 8 ч после инфицирования мышей эвтаназировали для выделения культур *A. baumannii* [35].

Самки мышей BALB/c весом 15 г также могут служить моделью для воспроизведения летального сепсиса. Внутрибрюшинное введение им культуры *A. baumannii* AB900 в дозе $5 \cdot 10^6$ КОЕ с 6%-м муцином приводит к гибели 100% поголовья в течение 12 ч. Снижение заражающей дозы в 5 раз сохраняет жизнь подопытным животным по крайней мере до 24 ч. Эту модель исследователи успешно применили в доклинических исследованиях по оценке лечебной эффективности бактериофага ϕ FG02, цефтазидима и их комбинации [36].

Другие авторы также применяли метод внутрибрюшинного заражения мышей C57BL/6 и BALB/c культурами ацинетобактера в сочетании с 5%-м муцином (1:1) для повышения чувствительности мышей к инфекции. Такой подход позво-

лял снизить летальную дозу вирулентных и гипервирулентных штаммов *A. baumannii* в 50–100 раз [37].

Модель системной инфекции успешно используют для оценки эффективности новых вакцин против *A. baumannii*-инфекций. Везикулы внешней мембраны *A. baumannii* в качестве вакцины защищали от гибели мышей BALB/c после заражения летальной дозой штамма ATCC 19606 [38].

В наших исследованиях была разработана модель летального сепсиса у мышей линии BALB/c, пригодная для оценки *in vivo* эффективности антибиотиков и специфических бактериофагов. В качестве возбудителя инфекции использовали наиболее вирулентные для мышей клинические штаммы различных капсульных типов из коллекции «ГКПМ-Оболensk» – *A. baumannii* B05 и *A. baumannii* 1432. Пригодность разработанной модели проверяли в экспериментах по антибиотико- и фаготерапии экспериментального ацинетобактерного сепсиса у мышей линии BALB/c.

Цель: разработка модели ацинетобактерной инфекции, пригодной для оценки *in vivo* лечебной эффективности антибактериальных препаратов.

Материалы и методы

Бактериальные культуры

Клинические штаммы *A. baumannii* B05 (Инв. № В-7705) и *A. baumannii* 1432 (Инв. № В-7134) из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk» были использованы для моделирования ацинетобактерной инфекции у мышей. Эти штаммы относятся к капсульным типам K9 и K27 соответственно. Штамм B05 чувствителен к ампициллину/сульбактаму, но устойчив к цефоперазону, цефотаксиму, цефтазидиму, цефепиму, имипенему, меропенему, гентамицину, амикацину, ципрофлоксацину и доксициклину. Штамм 1432 восприимчив к действию ампициллина/сульбактама, имипенема, меропенема, доксициклина и резистентен к цефалоспорином, амикацину, гентамицину и ципрофлоксацину.

Питательные среды, антибиотики, бактериофаги

Оценку чувствительности штаммов ацинетобактера к антибактериальным препаратам проводили на агаре Мюллера-Хинтона (HiMedia, Индия). Плотную питательную среду №1 ГРМ (ФБУН ГНЦПМБ, Россия) использовали для выращивания культур ацинетобактерий.

Для выявления клеток *A. baumannii* гомогенаты внутренних органов мышей и кровь высевали на среду №1 ГРМ с 25 мкг/мл гентамицина (ОАО «Дальхимфарм», Россия).

В экспериментах по лечению использовали ампициллин/сульбактам (ПАО «Красфарма», Россия), а также специфический бактериофаг AM24 (Инв. № Ph-106) [39] из Государственной коллекции «ГКПМ-Оболensk» и бактериофаг AS12 [40] из рабочей коллекции лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН ГНЦ ПМБ.

Лабораторные животные

Моделирование ацинетобактерной инфекции проводили на мышах линии BALB/c (самцы/самки, 18–20 г), полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Животных содержали в поликарбонатных клетках (Lab Products Inc., США) в помещениях со стандартными условиями микроклимата. Мыши имели постоянный доступ к воде и корму (ООО «Лабораторкорм»). Животных держали группами не более 6 животных в клетке соответствующего размера. Ветеринарное наблюдение за мышами проводили ежедневно. Умерших в процессе эксперимента животных удаляли из клеток по мере обнаружения.

Заражение лабораторных животных

Бактериальную взвесь для инфицирования животных готовили из ночной агаровой культуры. Выросшие колонии *A. baumannii* B05 и *A. baumannii* 1432 суспендировали в физиологическом растворе (0,85%-й хлорид натрия). Бактериальные взвеси доводили до оптической плотности 3,8 (по МакФарланду), что приблизительно соответствует $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Затем делали последовательные разведения суспензий в физиологическом растворе с 2,5%-м муцином до достижения необходимой концентрации клеток. Культуры вводили мышам внутривентрально в объеме 0,5 мл.

Изучение динамики развития ацинетобактерного сепсиса

Динамику развития у мышей сепсиса, вызываемого *A. baumannii* B05 и *A. baumannii* 1432, оценивали по степени специфической бактериальной обсемененности паренхиматозных органов (селезенка, легкое, почки) и уровню бактериемии через 1,5; 3; 6 и 12 ч после внутривентрального заражения. Мышей заражали культурами в дозе 40 ЛД₅₀. Таким образом, заражающая доза штамма B05 составляла $\sim 6 \cdot 10^5$ КОЕ, а штамма 1432 – $3,5 \cdot 10^5$ КОЕ. Для подавления иммунитета культуры вводили в 2,5%-м растворе муцина.

Для выявления функциональных и морфологических изменений внутренних органов в процессе развития генерализованной ацинетобактерной инфекции через 12 ч после инфицирования делали общий и биохимический анализ крови экспериментальных животных. В это же время проводили гистологическое исследование органов мышей (селезенки, легких, печени, регионарных лимфатических узлов и тимуса) для выявления патологических изменений.

Клинический анализ крови

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

Биохимический анализ крови

Уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы, общего белка, глюкозы и креатинина в сыворотках крови мышей определяли на полуавтоматическом биохимическом анализаторе StatFax-3300 (Awareness Technology, США) с использованием реактивов UTS (ООО «Юнимед», Россия). Для анализа брали индивидуальные образцы сывороток крови от 5 животных из экспериментальных и контрольных групп.

Бактериологический анализ органов

Животных эвтаназировали методом декапитации, а затем вскрывали для получения образцов органов. Селезенку, почки и легкие после взвешивания растирали в стерильных фарфоровых ступках с добавлением стерильного кварцевого песка. В гомогенаты добавляли 1 мл стерильного физиологического раствора и перемешивали до получения однородной суспензии. Полученные цельные суспензии высевали на поверхность ГРМ-агара с 25 мкг/мл гентамицина. Посевы инкубировали при температуре 36,5°C в течение 18–24 ч.

Гистологические исследования

Гистологические исследования органов мышей проводили через 12 ч после внутрибрюшинного заражения мышей культурами *A. baumannii* B05 и *A. baumannii* 1432. В качестве контролей использовали интактных мышей линии BALB/c и мышей, которым вводили внутрибрюшинно только раствор муцина (2,5%). Для микроскопического исследования брали селезенку, легкие, печень, регионарные лимфатические узлы и тимус. Полученные образцы помещали во флакон с 50 мл 4%-го раствора параформа. Через 24 ч экспозиции раствор параформа заменяли свежей порцией. Исследованию подвергали гистологические срезы органов, окрашенные гематоксилином и эозином по стандартной методике. Анализ гистологических препаратов проводили с использованием микроскопа Nikon Elipse 80i и программы анализа изображения NIS Elements F4.60.00. Определяли наличие признаков воспалительно-некротических изменений в исследуемых образцах.

Антибиотикотерапия летального ацинетобактерного сепсиса

Мышей инфицировали внутрибрюшинно культурой *A. baumannii* B05 или *A. baumannii* 1432 в дозе 40 ЛД₅₀. Затем животных случайным образом делили на 6 лечебных и одну контрольную группы (по 10 голов) для каждого штамма. Группу №1 лечили подкожно ампициллином/сульбактамом дважды в день в течение 5 дней. Разовая доза антибиотика составляла 200/100 мг/кг подкожно. Терапию начинали через 1,5 ч после заражения (раннее лечение). Животным из группы №2 давали этот же антибиотик однократно через 6 ч после инфицирования (позднее лечение). Мышам из экспериментальных групп №№ 3–5 назначали соответствующий бактериофаг: AM24 в случае штамма B05 и AS12 в случае штамма 1432. Разовая доза бактериофагов – 10⁹ БОЕ внутрибрюшинно. Группе №3 фаг вводили однократно за 1 ч до заражения (режим профилактики), группе № 4 – однократно через 1,5 ч после заражения, в группе №5 – однократно через 6 ч после заражения. Контрольная группа животных (№6) антибактериальных препаратов не получала. За животными наблюдали в течение 14 дней, регистрируя гибель животных и обсемененность клетками *A. baumannii* B05 или *A. baumannii* 1432 в крови и печени мышей у погибших и выживших животных.

Статистические методы

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

Результаты

Модель летального ацинетобактерного сепсиса у мышей

Внутрибрюшинное заражение мышей линии BALB/c культурой *A. baumannii* B05 или *A. baumannii* 3412 с муцином в дозе 40 ЛД₅₀ приводит к стремительному развитию сепсиса и 100%-й гибели в течение первых суток.

Бактериологический анализ внутренних органов и крови мышей показал, что после внутрибрюшинного введения культур *A. baumannii* B05 или *A. baumannii* 3412 с муцином в дозе 40 ЛД₅₀ они вызывают быструю генерализацию ацинетобактерной инфекции (табл. 1). Уже через 1,5 ч клетки *A. baumannii* в большом количестве содержались в почках, селезенке и легких всех мышей. У животных выявлялась бактериемия (1,74–2,0 LOG₁₀ КОЕ/мл). Через 12 ч сепсис достигал своего пика. Средняя концентрация клеток ацинетобактера штаммов B05 и 1432 в селезенке, легких и почках возрастала приблизительно на два порядка. Значительно (на 3,5 порядка) увеличивалась концентрация клеток патогена в крови.

Результаты общего анализа крови

Общий анализ крови мышей, зараженных внутрибрюшинно штаммами *A. baumannii* B05 и 1432 показал, что за 12 ч у мышей развиваются лейкоцитопения, лимфоцитопения, моноцитопения и тромбоцитопения (табл. 2). В то же время наблюдается достоверное повышение уровня гемоглобина.

Установлено, что введение мышам только 2,5%-го муцина приводит к достоверному ($p < 0,05$) повышению уровня моноцитов и гранулоцитов в крови по сравнению с интактными животными.

Результаты биохимического анализа крови

Через 12 ч после внутрибрюшинного введения мышам 2,5%-го муцина без бактериальных культур наблюдалось

Таблица 1. Обсемененность селезенки, легких, почек и крови мышей бактериями *A. baumannii* в различные сроки острой ацинетобактерной инфекции

Table 1. Contamination of the spleen, lungs, kidneys and blood of mice with *A. baumannii* bacteria at different stages of acute acinetobacter infection

Время после заражения, ч / Time after infection, h	LOG ₁₀ КОЕ/г (мл) / CFU/g (ml)			
	Селезенка / Spleen	Легкие / Lungs	Почки / Kidneys	Кровь / Blood
<i>A. baumannii</i> B05				
1,5	4,01 ± 0,20	3,98 ± 0,23	3,94 ± 0,25	2,00 ± 0,12
3	5,81 ± 0,16	5,67 ± 0,34	5,66 ± 0,14	3,71 ± 0,25
6	8,11 ± 0,25	7,88 ± 0,26	7,61 ± 0,26	6,01 ± 0,35
12	8,64 ± 0,57	8,71 ± 0,82	8,51 ± 0,42	7,11 ± 0,48
<i>A. baumannii</i> 1432*				
1,5	4,07 ± 0,13	3,53 ± 0,27	3,87 ± 0,12	1,74 ± 0,33
3	5,07 ± 0,56	5,18 ± 0,33	5,01 ± 0,25	3,22 ± 0,64
6	7,16 ± 0,27	7,07 ± 0,14	7,25 ± 0,19	4,13 ± 0,41
12	8,51 ± 0,17	8,76 ± 0,35	8,37 ± 0,09	7,20 ± 0,36
Приведены среднее значение и стандартное отклонение (n = 5). / The mean and standard deviation are given (n = 5).				

Таблица 2. Результаты клинического анализа крови мышей BALB/c после внутрибрюшинного введения 40 ЛД₅₀ *A. baumannii* B05 и 1432 через 12 ч после заражения
Table 2. Results of clinical blood analysis of BALB/c mice after intraperitoneal administration of 40 LD₅₀ *A. baumannii* B05 and 1432 12 hours after infection

Показатель / Indicator	Ед. измер. / Unit of measurement	Интактные мыши / Intact mice	2,5%-й муцин / 2.5% mucin	Штаммы / Strains	
				B05 с 2,5%-м муцином / with 2.5% mucin	1432 с 2,5%-м муцином / with 2.5% mucin
Лейкоциты / Leukocytes	×10 ⁹ /л	5,4 ± 1,5	7,1 ± 2,3	2,2 ± 0,5	2,2 ± 0,7
Лимфоциты / Lymphocytes	×10 ⁹ /л	3,9 ± 1,4	4,5 ± 1,7	1,9 ± 0,6	1,8 ± 0,7
Моноциты / Monocytes	×10 ⁹ /л	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0
Гранулоциты / Granulocytes	×10 ⁹ /л	1,4 ± 0,3	2,3 ± 0,7	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
Лимфоциты / Lymphocytes	%	70,5 ± 7,5	61,8 ± 4,8	81,9 ± 9,3	83,8 ± 6,0
Моноциты / Monocytes	%	3,2 ± 0,6	4,5 ± 0,5	2,2 ± 1,1	2,3 ± 1,0
Гранулоциты / Granulocytes	%	26,3 ± 7,1	33,7 ± 4,4	15,9 ± 8,3	13,8 ± 5,2
Эритроциты / Erythrocytes	×10 ¹² /л	9,68 ± 0,34	9,37 ± 0,91	10,20 ± 0,47	10,03 ± 0,49
Гемоглобин / Hemoglobin	г/л	146 ± 6	140 ± 11	155 ± 9	158 ± 8
Гематокрит / Hematocrit	%	43,5 ± 1,7	42,8 ± 3,8	46,3 ± 2,7	47,1 ± 2,6
Тромбоциты / Thrombocytes	×10 ⁹ /л	690 ± 81	718 ± 79	220 ± 69	422 ± 131
Тромбокрит / Thrombocrit	%	0,299 ± 0,049	0,323 ± 0,044	0,107 ± 0,035	0,189 ± 0,061

Приведено среднее значение и стандартное отклонение (n = 5); жирным шрифтом указаны значения, статистически значимо отличающиеся от контроля; все сравнения проводили по двустороннему t-критерию Стьюдента. / Mean and standard deviation (n = 5) are shown; values in bold are statistically significantly different from control; all comparisons were performed using a two-tailed Student's t-test.

Таблица 3. Результаты биохимического анализа крови мышей BALB/c после внутрибрюшинного введения 40 ЛД₅₀ *A. baumannii* B05 и 1432 через 12 ч после заражения
Table 3. Results of biochemical analysis of blood of BALB/c mice after intraperitoneal administration of 40 LD₅₀ *A. baumannii* B05 and 1432 12 h after infection

Показатель / Indicator	Интактные мыши / Intact mice	2,5%-й муцин / 2.5% mucin	Штаммы / Strains	
			B05 с 2,5%-м муцином / with 2.5% mucin	1432 с 2,5%-м муцином / with 2.5% mucin
Общий белок, г/л / Total protein, g/l	87,0 ± 4,6	75,2 ± 2,0	72,1 ± 1,5	69,2 ± 2,0
Глюкоза, ммоль/л / Glucose, mmol/l	8,1 ± 1,2	5,7 ± 0,7	2,4 ± 1,0	3,1 ± 0,5
Креатинин, мкмоль/л / Creatinine, μmol/l	53,4 ± 5,4	59,1 ± 4,1	66,1 ± 7,1	46,6 ± 6,9
Щелочная фосфатаза, МЕ/л / Alkaline phosphatase, IU/l	420,8 ± 166,0	563,3 ± 93,0	511,8 ± 88,1	485,5 ± 45,1
АЛТ, МЕ/л / ALT, IU/L	54,0 ± 6,2	42,1 ± 2,6	58,4 ± 21,6	37,1 ± 8,4
АСТ, МЕ/л / AST, IU/L	184,6 ± 59,1	191,8 ± 20,4	251,1 ± 94,2	186,1 ± 41,6
ЛДГ, МЕ/л / LDH, IU/L	525,3 ± 91,6	633,8 ± 66,7	940,3 ± 251,6	688,0 ± 115,9

Приведено среднее значение и стандартное отклонение (n = 5); жирным шрифтом указаны значения, статистически значимо отличающиеся от контроля; все сравнения проводили по двустороннему t-критерию Стьюдента. АСТ – аспартатаминотрансфераза, ЛДГ – лактатдегидрогеназа. / Mean and standard deviation (n = 5) are shown; values in bold are statistically significantly different from control; all comparisons were performed using a two-tailed Student's t-test.

снижение в сыворотках крови количества общего белка ($p < 0,003$), глюкозы ($p < 0,009$) и АЛТ ($p < 0,01$) (табл. 3).

После заражения мышей культурами *A. baumannii* B05 и 1432 с муцином отмечается более выраженное снижение концентрации в крови общего белка и глюкозы. В случае штамма 1432 значительно понижается уровень креатинина и АЛТ.

Выявленные у инфицированных животных отклонения от нормы биохимических показателей крови говорят о наличии у них нарушений функции печени, поджелудочной железы и почек. Эти функциональные изменения органов являются следствием быстро развившегося ацинетобактерного сепсиса.

Данные гистологических исследований

Через 12 ч после внутрибрюшинного заражения мышей штаммом *A. baumannii* B05 или *A. baumannii* 1432 с муцином

было проведено гистологическое исследование внутренних органов мышей (селезенка, легкие, печень, регионарные лимфатические узлы и тимус) с целью выявления патологических изменений.

Печень. Микроскопическое исследование образцов печени мышей, инфицированных внутрибрюшинно *A. baumannii* B05, показало некоторые отклонения от нормы. В просветах некоторых венозных сосудов имелось множество нейтрофилов, а также тромбы, которые состоят из гомогенного эозинотельно окрашенного вещества рыхлой консистенции и краевой базофильно окрашенной части, состоящей из нейтрофилов (рис. 1А).

В случае штамма *A. baumannii* 1432 также выявляются отклонения от нормы в печени мышей, выражающиеся в формировании в просветах сосудов плотных клеточных скоплений, состоящих в основном из лейкоцитов. Среди лейко-

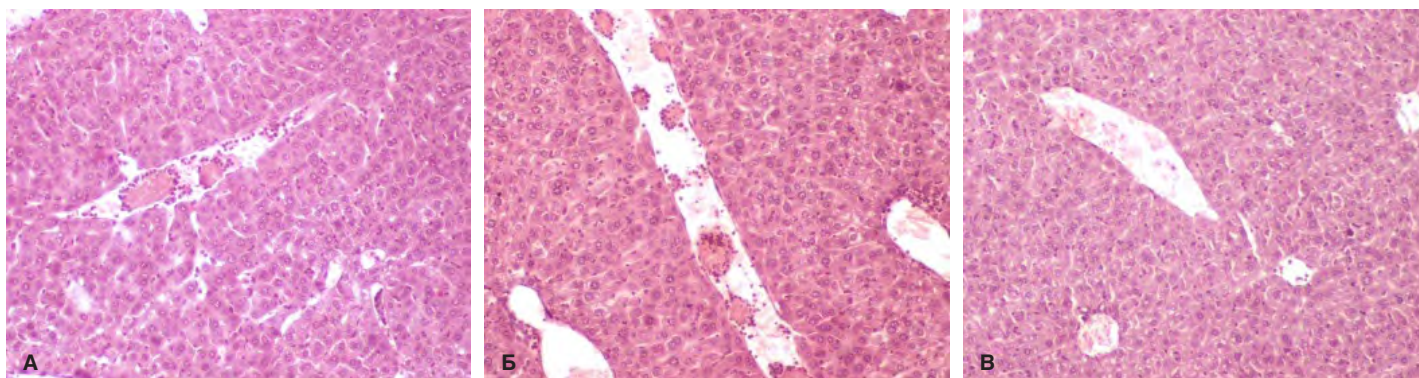


Рис. 1. Микрофотографии срезов печени мышей BALB/c, инфицированных внутрибрюшинно культурой *A. baumannii* в дозе 40 ЛД₅₀, 12 ч после заражения: А – *A. baumannii* B05 с 2,5%-м муцином: тромбы в сосудистой системе печени; Б – *A. baumannii* 1432 с 2,5%-м муцином: на продольном срезе венозного сосуда видны многочисленные тромбы; В – 2,5%-й муцин: патология отсутствует. На поперечных и продольных срезах кровеносных сосудов видно, что в сосудах находится некоторое количество эритроцитов и единичные лейкоциты. В печеночных капиллярах встречаются единичные клетки крови. Увеличение $\times 10$.

Fig. 1. Micrographs of liver sections from BALB/c mice infected intraperitoneally with *A. baumannii* culture at a dose of 40 LD₅₀, 12 hours after infection: A – *A. baumannii* B05 with 2.5% mucin: thrombi in the vascular system of the liver; B – *A. baumannii* 1432 with 2.5% mucin: numerous thrombi are visible on the longitudinal section of the venous vessel; C – 2.5% mucin: pathology is absent. Transverse and longitudinal sections of blood vessels show that there are a certain number of erythrocytes and single leukocytes in the vessels. Single blood cells are found in the liver capillaries. Magnification $\times 10$.

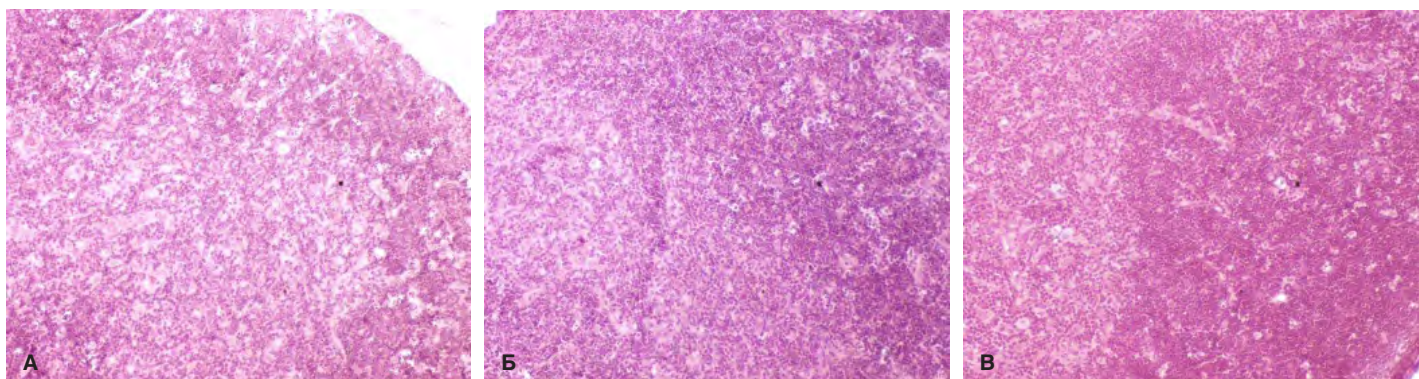


Рис. 2. Микрофотографии срезов тимуса мышей BALB/c, инфицированных внутрибрюшинно культурой *A. baumannii* в дозе 40 ЛД₅₀, 12 ч после заражения: А – *A. baumannii* B05 с 2,5%-м муцином: уменьшение толщины коркового слоя и его плотности. В мозговом веществе имеются участки апоптоза; Б – *A. baumannii* 1432 с 2,5%-м муцином: корковый слой истончен, множество участков апоптоза клеток; В – 2,5%-м муцин: патология отсутствует. Увеличение $\times 10$.

Fig. 2. Micrographs of thymus sections from BALB/c mice infected intraperitoneally with *A. baumannii* culture at a dose of 40 LD₅₀, 12 hours after infection: A – *A. baumannii* B05 with 2.5% mucin: decrease in the thickness of the cortex and its density. There are areas of apoptosis in the medulla; B – *A. baumannii* 1432 with 2.5% mucin: the cortex is thinned, there are many areas of cell apoptosis; C – 2.5% mucin: pathology is absent. Magnification $\times 10$.

цитов преобладают нейтрофилы, в меньшем количестве имеются моноциты и лимфоциты. Кроме того, в венах печени встречаются тромбы. Тромбы состоят из лейкоцитов и компонентов крови, образующих рыхлую волокнистую массу (рис. 1Б).

У контрольных мышей, получавших только муцин, патологических изменений в печени не выявлено. Клетки паренхимы имеют нормальное строение и окраску (рис. 1В).

Тимус. Через 12 ч после введения мышам BALB/c культуры *A. baumannii* B05 с 2,5%-м муцином в корковом и мозговом веществе тимуса резко уменьшалось количество лимфоцитов. Кортикальное вещество занимало узкую полосу по краю долек, выглядело рыхлым и в отдельных участках приближалось по плотности клеток к мозговому веществу. В зоне коркового вещества находилось множество очажков из апоптозных тел, образовавшихся в результате массовой гибели клеток (рис. 2А).

Гистологическое исследование тимуса у мышей, которых заражали штаммом *A. baumannii* 1432, показало, что количе-

ство лимфоцитов в тимусе уменьшено по сравнению с тимусом контрольных мышей, получивших только муцин. Преимущественно это затрагивает корковое вещество. Ширина коркового вещества в дольках тимуса сужается. Кроме того, происходит гибель множества клеток путем апоптоза. Наличие скоплений апоптозных тел отмечается по всей площади коркового вещества (рис. 2Б).

У контрольных мышей патологических изменений в тимусе не выявлено. Во всех его дольках сохраняется широкая полоса коркового вещества из плотно расположенных лимфоцитов. В центральной части долек, в мозговом веществе лимфоцитов меньше, что соответствует норме (рис. 2В).

Селезенка. Гистологическое исследование селезенки мышей, проведенное через 12 ч после заражения *A. baumannii* B05, показало, что белая пульпа состоит из отдельных лимфатических фолликулов разной величины. Фолликулы резко ограничены от красной пульпы. Центры размножения не выявлены. В красной пульпе имеется множество участков с малым количеством клеток и хорошо

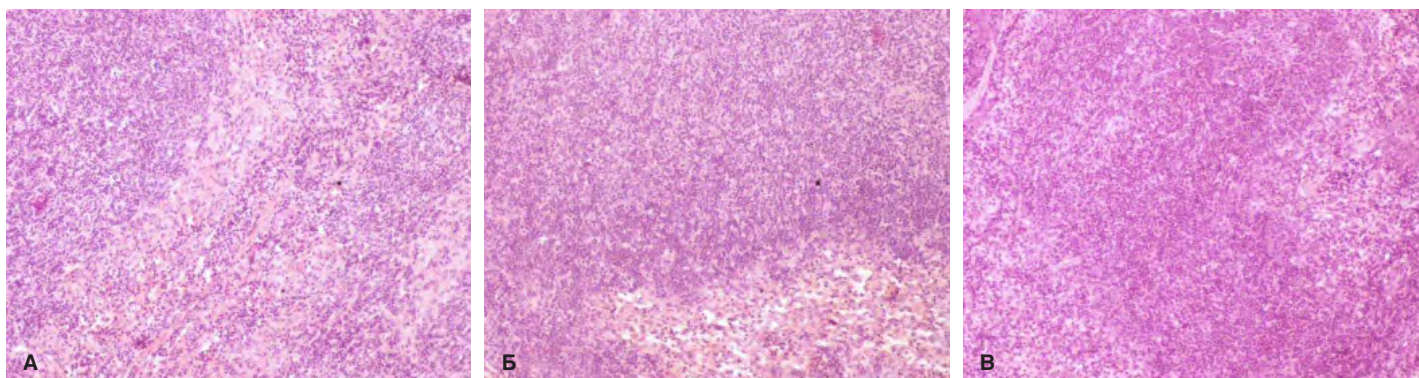


Рис. 3. Микрофотографии срезов селезенки мышей BALB/c, инфицированных внутрибрюшинно культурой *A. baumannii* в дозе 40 ЛД₅₀, 12 ч после заражения: А – *A. baumannii* B05 с 2,5%-м муцином: в белой пульпе отсутствуют центры размножения лимфоцитов. В красной пульпе имеется множество участков с малым количеством клеток; Б – *A. baumannii* 1432 с 2,5%-м муцином: на срезе преобладает белая пульпа, в которой имеется большое количество лимфоцитов. В красной – концентрация лимфоцитов снижена; В – 2,5%-й муцин: отклонений от нормы нет. Увеличение $\times 10$.

Fig. 3. Micrographs of spleen sections from BALB/c mice infected intraperitoneally with *A. baumannii* culture at a dose of 40 LD₅₀, 12 hours after infection: A – *A. baumannii* B05 with 2.5% mucin: there are no lymphocyte proliferation centers in the white pulp. There are many areas with a small number of cells in the red pulp; B – *A. baumannii* 1432 with 2.5% mucin: the section is dominated by white pulp, which contains a large number of lymphocytes. In the red pulp, the concentration of lymphocytes is reduced; B – 2.5% mucin: no deviations from the norm. Magnification $\times 10$.

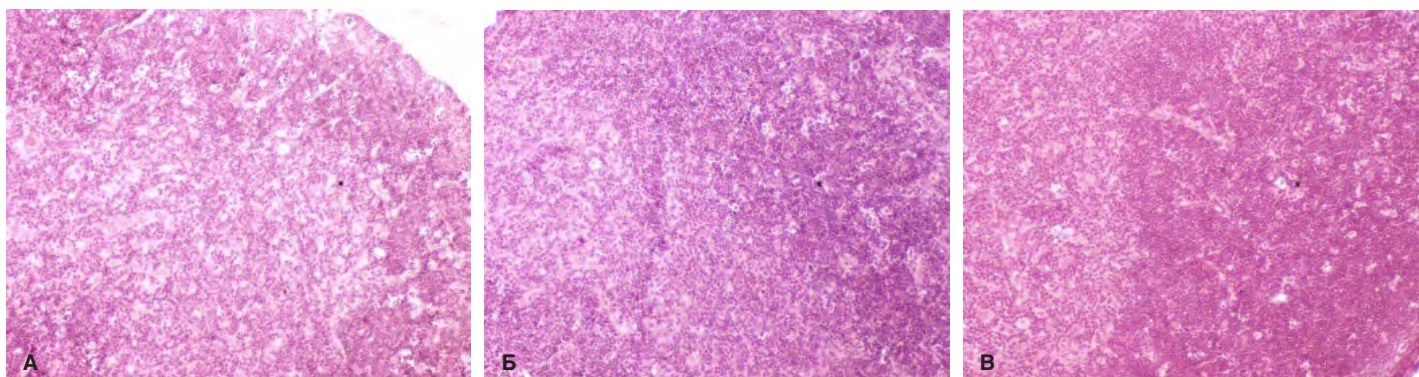


Рис. 4. Микрофотографии срезов лимфатического узла мышей BALB/c, инфицированных внутрибрюшинно культурой *A. baumannii* в дозе 40 ЛД₅₀, 12 ч после заражения: А – *A. baumannii* B05 с 2,5%-м муцином: отсутствуют центры размножения лимфоцитов. В корковом и мозговом веществе снижено количество клеток; Б – *A. baumannii* 1432 с 2,5%-м муцином: корковое вещество содержит большое количество лимфоцитов и центров их размножения; В – 2,5%-й муцин: отклонений от нормы нет. Увеличение $\times 10$.

Fig. 4. Micrographs of lymph node sections from BALB/c mice infected intraperitoneally with *A. baumannii* culture at a dose of 40 LD₅₀, 12 hours after infection: A – *A. baumannii* B05 with 2.5% mucin: no lymphocyte proliferation centers. The number of cells is reduced in the cortex and medulla; B – *A. baumannii* 1432 with 2.5% mucin: the cortex contains a large number of lymphocytes and their proliferation centers; C – 2.5% mucin: no deviations from the norm. Magnification $\times 10$.

видимой стромой. Также есть участки с лимфоцитами, которые располагаются неравномерно, рыхлыми скоплениями, и очаговые скопления нейтрофилов, в т.ч. разрушенных (рис. 3А).

В случае штамма 1432 основная площадь среза селезенки представлена белой пульпой. Обширные участки селезенки заполнены множеством лимфоцитов, среди которых имеются небольшой величины центры размножения. В красной пульпе находится небольшое количество лимфоцитов, а также преимущественно разрушенных нейтрофилов (рис. 3Б).

Белая пульпа селезенки мышей, получавших только муцин, занимает большую площадь в селезенке. Крупные лимфатические фолликулы сливаются, образуя обширные поля из плотного скопления лимфоцитов и центров размножения лимфоцитов. В красной пульпе находится множество лимфоцитов (рис. 3В). Микроскопическая картина соответствует норме.

Лимфатический узел. Анализ гистологических срезов лимфатических узлов мышей, зараженных *A. baumannii* B05,

выявил уменьшение количества лимфоцитов в корковом и мозговом веществе по сравнению с лимфатическими узлами мышей, получивших муцин. По краю лимфатического узла сохраняется узкая плотная полоса из лимфоцитов. Центры размножения не обнаружены. Остальная площадь лимфатического узла представлена рыхло расположенными небольшими скоплениями лимфоцитов, между которыми видна строма с единичными лимфоцитами (рис. 4А).

Патологические изменения в лимфоузлах животных, инфицированных штаммом 1432, носят иной характер. Кортиковое вещество лимфатического узла занимает широкую зону по его краю. В нем содержится большое количество плотно расположенных лимфоцитов, среди которых расположены небольшие центры размножения. Синусы коркового и мозгового вещества расширены и плотно заполнены лимфоцитами. Это указывает на увеличение количества лимфоцитов, проходящих через лимфатический узел (рис. 4Б).

Под воздействием муцина лимфатический узел равномерно заполняется лимфоцитами. В корковом веществе

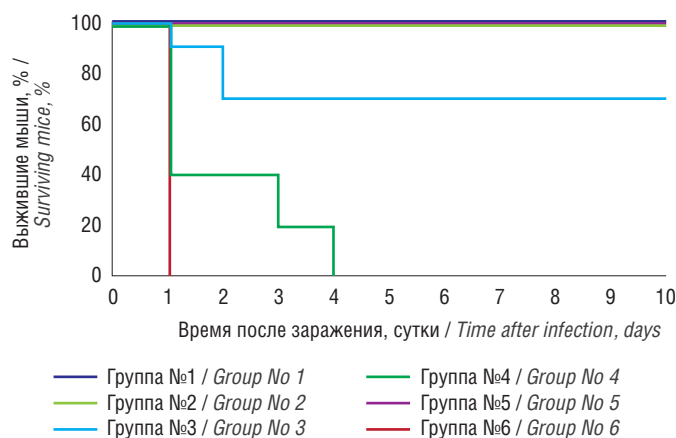


Рис. 5. Выживаемость мышей BALB/c в результате профилактики и лечения летального сепсиса, вызываемого внутрибрюшинным заражением штаммом *A. baumannii* B05 (см. Материалы и методы).
 Fig. 5. Survival of BALB/c mice as a result of prevention and treatment of lethal sepsis caused by intraperitoneal challenge with strain *A. baumannii* B05 (see Materials and Methods).

лимфатического узла отмечается наличие крупных центров размножения (рис. 4B).

На срезах легких и почек инфицированных и контрольных мышей патоморфологических изменений не выявлено.

Антибиотикотерапия экспериментального ацинетобактерного сепсиса

Результаты экспериментального лечения летальной ацинетобактерной инфекции, вызванной штаммом B05, показали эффективность ампициллина/сульбактама при пятидневном курсе лечения (рис. 5). Выживаемость среди животных составила 100%. Однократное введение антибиотика через 6 ч после инфицирования оказалось неэффективным: все животные умерли к 4-м суткам инфекции, причем 6 из 10 животных погибли через сутки после заражения.

Бактериофаг AM24 также проявил высокую антибактериальную активность *in vivo* в отношении *A. baumannii* B05. В режиме профилактики он защищал от гибели всех подопытных животных (рис. 5). Однократная инъекция фагового препарата при раннем и позднем начале лечения обеспечивала выживаемость 100 и 70% инфицированных мышей соответственно. Бактериологический анализ крови и печени выживших в течение 10 дней мышей показал, что все животные были санированы от бактерий *A. baumannii* B05.

Ампициллин/сульбактам дал хороший лечебный эффект только при курсовом применения у мышей, инфицированных штаммом *A. baumannii* 3412 (рис. 6). Выживаемость среди животных составила 100%. Однократное введение антибиотика через 6 ч после заражения защищало от гибели только 20% мышей. Смерть животных наступала в период с 2-х по 3-и сутки после заражения.

Фаготерапия приводила к более выраженному терапевтическому эффекту по сравнению с антибиотикотерапией. Одной инъекции бактериофага AS12 в дозе 10^9 БОЕ оказалось достаточно, чтобы все животные полностью излечились от ацинетобактерной инфекции, причем этот эффект был характерен при использовании фага в режиме профилактики, экстренного лечения и позднего лечения. Положи-

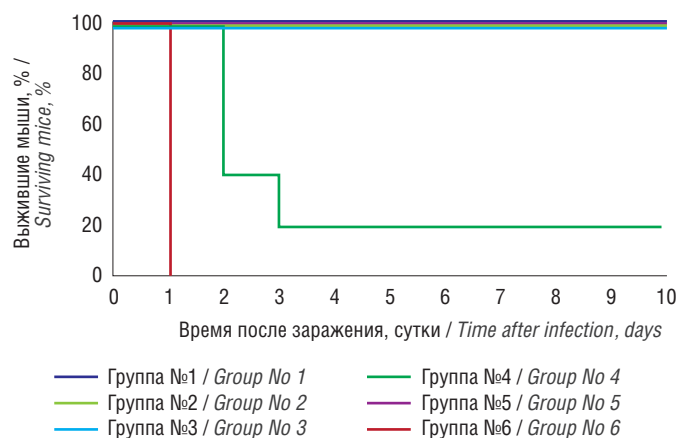


Рис. 6. Выживаемость мышей BALB/c в результате профилактики и лечения летального сепсиса, вызываемого внутрибрюшинным заражением штаммом *A. baumannii* 1432.
 Fig. 6. Survival of BALB/c mice following prophylaxis and treatment of lethal sepsis caused by intraperitoneal challenge with *A. baumannii* strain 1432.

тельные результаты фаготерапии и антибиотикотерапии особенно выделяются на фоне гибели в 1-е сутки 100% мышей из контрольной группы, не получавшей антибактериальных препаратов.

Обсуждение

Доклинические исследования различных антибактериальных препаратов предполагают проведение экспериментов по определению их лечебной эффективности на животных моделях. Наиболее удобной и показательной моделью является летальная инфекция. В своей работе мы представили экспериментальные данные, описывающие две модели ацинетобактерного сепсиса у мышей, вызываемого клиническими штаммами капсульных типов K9 и K27 – *A. baumannii* B05 и *A. baumannii* 3412 соответственно. В качестве животной модели инфекции были выбраны мыши линии BALB/c, которые наиболее часто используются для подобных целей [35–38].

Среди изученных нами культур *A. baumannii* из государственной коллекции «ГКПМ_Оболensk» штаммы B05 и 3412 обладали наибольшей вирулентностью. Тем не менее здоровые мыши различных линий достаточно устойчивы к ацинетобактерной инфекции. По нашим данным, среднелетальная доза (LD_{50}) штамма B05 при внутрибрюшинном введении иммунокомпетентным мышам BALB/c составляет $2,7 \cdot 10^7$ КОЕ, а штамма 1432 – $5,1 \cdot 10^7$ КОЕ. Поэтому для повышения чувствительности подопытных животных к ацинетобактерной инфекции взвеси тест-штаммов вводили в 2,5%-м растворе муцина. В результате показатели LD_{50} *A. baumannii* B05 понижалась до $1,5 \cdot 10^4$ КОЕ, а *A. baumannii* 1432 – до $8,5 \cdot 10^3$ КОЕ. Известно, что муцин обладает способностью снижать количество перитонеальных макрофагов и лимфоцитов, подавлять функциональную активность макрофагов, вызывать воспалительные клеточные и цитокиновые реакции, что способствует развитию инфекции у модельных животных [37, 41]. В литературе имеются сведения о повышении вирулентности штаммов ацинетобактера на два порядка под влиянием муцина [37].

Летальную ацинетобактерную инфекцию моделировали на мышах линии BALB/c, которых заражали внутрибрюшинно тест-штаммами в дозе 40 ЛД₅₀ с муцином. Уже через 1,5 ч после инфицирования клетки *A. baumannii* проникали в селезенку, почки и легкие всех мышей. У животных развивалась выраженная бактериемия. Через 12 ч уровень обсемененности внутренних органов клетками ацинетобактера возрастал на 4–5 порядков. В крови достоверно уменьшалось количество лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов и тромбоцитов. Результаты биохимического анализа крови свидетельствовали о нарушении функции печени и почек, что выражалось в снижении уровня белка, глюкозы, АЛТ и креатина. Гистологические исследования показали, что у мышей с ацинетобактерным сепсисом развиваются схожие для обоих тест-штаммов патологические изменения. В кровеносных сосудах печени образуются множественные тромбы. В тимусе, центральном органе иммунной системы, наблюдается апоптоз Т-лимфоцитов. В селезенке происходит накопление и массовая гибель нейтрофилов. В периферических органах иммунной системы мышей отмечены изменения, указывающие на некоторые различия в воздействии штаммов *A. baumannii* 1432 и *A. baumannii* B05. В первом случае в лимфатических фолликулах селезенки и лимфатических узлов выявляются активные центры размножения лимфоцитов, а для штамма B05 характерно исчезновение центров их размножения.

Разработанная нами летальная модель ацинетобактерного сепсиса была апробирована в экспериментах по антибиотико- и фаготерапии инфекции у мышей. В качестве этиотропных препаратов для лечения мы использовали высокоактивный против обоих тест-штаммов ампициллин/сульбактам и специфические бактериофаги AM24 и AS12. Доза антибиотика была эквивалентной человеческой и рассчитана с учетом соответствующего коэффициента [42]. Разовая доза фагов составила 10⁹ БОЕ. Наш опыт показывает, что внутрибрюшинное введение бактериофагов в дозе 10⁸–10⁹ БОЕ/мышь дает выраженный положительный эффект при лечении экспериментального сепсиса различной этиологии [43–48].

Результативность терапии ацинетобактерного сепсиса оценивали по выживаемости животных и санации их организма от бактерий *A. baumannii* B05 или *A. baumannii* 3412. В результате фаготерапия оказалась более эффективной, чем антибиотикотерапия. Ампициллин/сульбактам и фаги, вводимые через 1,5 ч после заражения, обеспечивали 100%-ю выживаемость и санацию мышей от клеток ацинетобактера. Но антибиотик вводили в течение 5 дней, а фаги – однократно. AM24 и AS12 давали абсолютный лечебный результат при однократном применении как при раннем начале лечения, так и при профилактике ацинетобактерного сепсиса. Однократное назначение антибиотика через 6 ч после инфицирования оказалось неэффективным по сравнению с фагами. В случае штамма *A. baumannii* B05 от инфекции погибло 100% мышей, а в случае штамма 1432 – 80%. Фаг AM24 в режиме позднего лечения защищал от гибели только 70% мышей. В это время уровень колонизации печени, легких, почек и крови животных клетками ацинетобактера был приблизительно на 4 порядка выше, чем через 1,5 ч после заражения. О меньшей терапевтической эффективности фаготерапии при более позднем ее начале сообщает и Jiun-Ling Wang [49]. По его данным, у мышей BALB/c с летальным ацинетобактерным сепсисом, получавших фаг фкм18р с задержкой в 1 ч, выживаемость снизилась примерно до 50% по сравнению с одновременным внутрибрюшинным введением культуры и фага (100%-я выживаемость). В случае летального сепсиса, вызванного штаммом 1432, все схемы профилактики и лечения фагом AS12 дали абсолютный лечебный эффект – 100% вылеченных животных.

Таким образом, разработанные нами модели ацинетобактерной инфекции продемонстрировали их пригодность для оценки лечебной эффективности различных антибактериальных препаратов. Модель летального сепсиса, обусловленного *A. baumannii* B05, мы успешно применили в своей работе по изучению активности специфичного для K9 вирулентного фага AM24 и кодируемой фагом деполимеразы DepAPK09 [50].

Другие авторы также использовали септическую модель ацинетобактерной инфекции для оценки эффективности специфичных бактериофагов и антибиотиков [36, 49, 51, 52]. Altamirano, например, показал, что бактериофаг ØFG02 достоверно снижает нагрузку на органы мышей *A. baumannii* AB900 при внутрибрюшинном введении [36]. При этом у клеток ацинетобактера возникает устойчивость к фагу, связанная с утратой капсулы. Благодаря этому возбудитель становился чувствительным к цефтазидиму. В других исследованиях бактериофаг PD6A3 и эндолизин Ply6A3 защищали от летальной септической инфекции мышей, инфицированных внутрибрюшинно минимальной летальной дозой (1·10⁹ КОЕ) *A. baumannii* 32. Выживаемость животных после однократного введения PD6A3 (10⁹ БОЕ) и Ply6A3 (2 мг) через 1 ч после заражения составила 60 и 70% соответственно [43].

Заключение

Разработанные модели ацинетобактерной инфекции позволяют оценивать профилактическую и лечебную активность антибактериальных препаратов. Эффективность экспериментальной фаготерапии и антибиотикотерапии может достигать 100% в зависимости от схемы применения.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Funding information

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests.

Литература / References

1. Rebic V, Masic N, Teskeredzic S, Aljicevic M. The importance of *Acinetobacter* species in the hospital environment. Med Arch. 2018;72(5):330-334. DOI: 10.5455/medarch.2018.72.330-334

2. Fernando DM, Khan IU, Patidar R, Lapen DR. Isolation and characterization of *Acinetobacter baumannii* recovered from campylobacter selective medium. *Front Microbiol.* 2016;7:1871. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01871
3. Visca P, Seifert H, Towner KJ, Visca P. *Acinetobacter* infection – an emerging threat to human health. *IUBMB Life.* 2011 Dec;63(12):1048-54. DOI: 10.1002/iub.534
4. Almasaudi SB. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology and resistance feature. *Saudi J Biol Sci.* 2018;25:586-596. DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.02.009
5. Ayobami O, Willrich N, Harder T, Okeke IN. The incidence and prevalence of hospital-acquired (carbapenem-resistant) *Acinetobacter baumannii* in Europe, Eastern Mediterranean and Africa: a systematic review and meta-analysis. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8(1):1747-1759. DOI: 10.1080/22221751.2019.1698273
6. van den Broek PJ, Arends J, Bernards AT, De Brauwier E, Mascini EM, van der Reijden TJ, et al. Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in The Netherlands during the period 1999–2001. *Clin Microbiol Infect.* 2006 Sep;12(9):837-43. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2006.01510.x
7. Matsuzaki S, Rashel M, Uchiyama J, Sakurai S, Ujihara T, Kuroda M, et al. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Infect Chemother.* 2005 Oct;11(5):211-9. DOI: 10.1007/s10156-005-0408-9
8. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Oct;51(10):3471-84. DOI: 10.1128/AAC.01464-06
9. Gaynes R, Edwards JR; National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis.* 2005 Sep 15;41(6):848-54. DOI: 10.1086/432803
10. Bergogne-Berezin E, Friedman H, Bendinelli M. *Acinetobacter*: Biology and Pathogenesis. New York: Springer, 2008.
11. King LB, Pangburn MK, McDaniel LS. Serine protease PKF of *Acinetobacter baumannii* results in serum resistance and suppression of biofilm formation. *J Infect Dis.* 2013 Apr;207(7):1128-34. DOI: 10.1093/infdis/jis939
12. Russo TA, Luke NR, Beanan JM, Olson R, Sauberman SL, MacDonald U, et al. The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infect Immun.* 2010 Sep;78(9):3993-4000. DOI: 10.1128/IAI.00366-10
13. Choi CH, Lee JS, Lee YC, Park TI, Lee JC. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC Microbiol.* 2008 Dec 10;8:216. DOI: 10.1186/1471-2180-8-216
14. Qiu H, KuoLee R, Harris G, Van Rooijen N, Patel GB, Chen W. Role of macrophages in early host resistance to respiratory *Acinetobacter baumannii* infection. *PLoS One.* 2012;7(6):e40019. DOI: 10.1371/journal.pone.0040019
15. Rodríguez-Baño J, Martí S, Soto S, Fernández-Cuenca F, Cisneros JM, Pachón J, et al. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. *Clin Microbiol Infect.* 2008 Mar;14(3):276-8. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2007.01916.x
16. Morris FC, Dexter C, Kostoulas X, Uddin MI, Peleg AY. The Mechanisms of Disease Caused by *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol.* 2019 Jul 17;10:1601. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01601
17. Rodríguez-Villodres Á, Martín-Gandul C, Peñalva G, Guisado-Gil AB, Crespo-Rivas JC, Pachón-Ibáñez ME, et al. Prevalence and Risk Factors for Multidrug-Resistant Organisms Colonization in Long-Term Care Facilities Around the World: A Review. *Antibiotics (Basel).* 2021 Jun 7;10(6):680. DOI: 10.3390/antibiotics10060680
18. Alsan M, Klompas M. *Acinetobacter baumannii*: An Emerging and Important Pathogen. *J Clin Outcomes Manag.* 2010 Aug;17(8):363-369.
19. МР № 016-0311. Принципы диагностики и лечения *A. baumannii*-ассоциированных инфекций: инструкция по применению: утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь 8 апреля 2011 г. Минск, 2011;5. / MR № 016-0311. Printsipy diagnostiki i lecheniya *A. baumannii*-assotsirovannykh infektsii: instruktsiya po primeneniyu: utverzhdena Ministerstvom zdoravookhraneniya Respubliki Belarus' 8 aprelya 2011 g. Minsk, 2011;5. (In Russian).
20. Mohd Sazly Lim S, Zainal Abidin A, Liew SM, Roberts JA, Sime FB. The global prevalence of multidrug-resistance among *Acinetobacter baumannii* causing hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia and its associated mortality: A systematic review and meta-analysis. *J Infect.* 2019 Dec;79(6):593-600. DOI: 10.1016/j.jinf.2019.09.012
21. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A. 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
22. Дмитриева НД, Григорьевская ЗВ, Дьякова СЯ, Ключникова ИА, Петухова ИН. Разработка стратегических подходов терапии инфекций, вызванных мультирезистентными *Acinetobacter baumannii*. *Сибирский онкологический журнал.* 2012;4(52):11-19. / Dmitrieva NV, Grigoryevskaya ZV, Dyakova SA, Klyuchnikova IA, Petuchova IN. Development of strategic approaches to therapy of infections caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Siberian Journal of Oncology.* 2012;4(52):11-19. (In Russian).
23. Fischetti VA. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr Opin Microbiol.* 2008 Oct;11(5):393-400. DOI: 10.1016/j.mib.2008.09.012
24. Lood R, Winer BY, Pelzek AJ, Diez-Martinez R, Thandar M, Euler CW, et al. Novel phage lysin capable of killing the multidrug-resistant gram-negative bacterium *Acinetobacter baumannii* in a mouse bacteremia model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Apr;59(4):1983-91. DOI: 10.1128/AAC.04641-14
25. Oliveira H, Vilas Boas D, Mesnage S, Kluskens LD, Lavigne R, Sillankorva S, et al. Structural and Enzymatic Characterization of ABgp46, a Novel Phage Endolysin with Broad Anti-Gram-Negative Bacterial Activity. *Front Microbiol.* 2016 Feb 26;7:208. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00208
26. Antonova NP, Vasina DV, Lendel AM, Usachev EV, Makarov VV, Gintsburg AL, et al. Broad Bactericidal Activity of the Myoviridae Bacteriophage Lysins LysAm24, LysECD7, and LysSi3 against Gram-Negative ESKAPE Pathogens. *Viruses.* 2019 Mar 21;11(3):284. DOI: 10.3390/v11030284
27. Larpin Y, Oechslin F, Moreillon P, Resch G, Entenza JM, Mancini S. *In vitro* characterization of PlyE146, a novel phage lysin that targets Gram-negative bacteria. *PLoS One.* 2018 Feb 6;13(2):e0192507. DOI: 10.1371/journal.pone.0192507
28. Lai MJ, Lin NT, Hu A, Soo PC, Chen LK, Chen LH, et al. Antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* phage ϕ AB2 endolysin (LysAB2) against both gram-positive and gram-negative bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011 Apr;90(2):529-39. DOI: 10.1007/s00253-011-3104-y
29. Huang G, Shen X, Gong Y, Dong Z, Zhao X, Shen W, et al. Antibacterial properties of *Acinetobacter baumannii* phage Abp1 endolysin (PlyAB1). *BMC Infect Dis.* 2014 Dec 12;14:681. DOI: 10.1186/s12879-014-0681-2
30. Abdelkader K, Gerstmanns H, Saafan A, Dishisha T, Briers Y. The Preclinical and Clinical Progress of Bacteriophages and Their Lytic Enzymes: The Parts are Easier than the Whole. *Viruses.* 2019 Jan 24;11(2):96. DOI: 10.3390/v11020096
31. Ketter PM, Guentzel MN, Schaffer B, Herzig M, Wu X, Montgomery RK, et al. Severe *Acinetobacter baumannii* sepsis is associated with elevation of pentraxin 3. *Infect Immun.* 2014 Sep;82(9):3910-8. DOI: 10.1128/IAI.01958-14
32. Harris G, Holbein BE, Zhou H, Xu HH, Chen W. Potential Mechanisms of Mucin-Enhanced *Acinetobacter baumannii* Virulence in the Mouse Model of Intraperitoneal Infection. *Infect Immun.* 2019 Oct 18;87(11):e00591-19. DOI: 10.1128/IAI.00591-19
33. Ko WC, Lee HC, Chiang SR, Yan JJ, Wu JJ, Lu CL, et al. *In vitro* and *in vivo* activity of meropenem and sulbactam against a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Feb;53(2):393-5. DOI: 10.1093/jac/dkh080
34. Sato Y, Tansho-Nagakawa S, Ubagai T, Ono Y. Analysis of Immune Responses in *Acinetobacter baumannii*-Infected Klotho Knockout Mice: A Mouse Model of

- Acinetobacter baumannii* Infection in Aged Hosts. Front Immunol. 2020 Nov 23;11:601614. DOI: 10.3389/fimmu.2020.601614
35. Gordillo Altamirano F, Forsyth JH, Patwa R, Kostoulis X, Trim M, Subedi D, et al. Bacteriophage-resistant *Acinetobacter baumannii* are resensitized to antimicrobials. Nat Microbiol. 2021 Feb;6(2):157-161. DOI: 10.1038/s41564-020-00830-7
36. Gordillo Altamirano FL, Kostoulis X, Subedi D, Korneev D, Peleg AY, Barr JJ. Phage-antibiotic combination is a superior treatment against *Acinetobacter baumannii* in a preclinical study. EBioMedicine. 2022 Jun;80:104045. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.104045
37. Harris G, Holbein BE, Zhou H, Xu HH, Chen W. Potential Mechanisms of Mucin-Enhanced *Acinetobacter baumannii* Virulence in the Mouse Model of Intraperitoneal Infection. Infect Immun. 2019 Oct 18;87(11):e00591-19. DOI: 10.1128/IAI.00591-19
38. McConnell MJ, Rumbo C, Bou G, Pachón J. Outer membrane vesicles as an acellular vaccine against *Acinetobacter baumannii*. Vaccine. 2011 Aug 5;29(34):5705-10. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.06.001
39. Popova AV, Shneider MM, Myakinina VP, Bannov VA, Edelstein MV, Rubalskii EO, et al. Characterization of myophage AM24 infecting *Acinetobacter baumannii* of the K9 capsular type. Arch Virol. 2019 May;164(5):1493-1497. DOI: 10.1007/s00705-019-04208-x
40. Popova AV, Lavyshe DG, Klimuk EI, Edelstein MV, Bogun AG, Shneider MM, et al. Novel Fri1-like Viruses Infecting *Acinetobacter baumannii*-vB_AbaP_AS11 and vB_AbaP_AS12-Characterization, Comparative Genomic Analysis, and Host-Recognition Strategy. Viruses. 2017 Jul 17;9(7):188. DOI: 10.3390/v9070188
41. Sein J, Cachicas V, Becker MI, De Ioannes AE. Mucin allows survival of *Salmonella* Typhi within mouse peritoneal macrophages. Biol Res. 1993;26(3):371-9.
42. Гуськова ТА. Токсикология лекарственных средств. М., 2003;153. / Gus'kova TA. Toksikologiya lekarstvennykh sredstv. M., 2003;153. (In Russian).
43. Борзилов АИ, Мякина ВП, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Красильникова ВМ, Верёвкин ВВ, и др. Оценка лечебно-профилактической эффективности бактериофага *Klebsiella pneumoniae* vB_KpnP_KpV289 на модели острого сепсиса у мышей. Бактериология. 2017;2(1):73-77. / Borzilov AI, Myakinina VP, Korobova OV, Kombarova TI, Krasilnikova VM, Verevkin VV, et al. Evaluation of preventive and therapeutic efficacy of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage vB_KpnP_KpV289 on the model of acute sepsis in mice. Bacteriology. 2017;2(1):73-77. (In Russian).
44. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Абаев ИВ. Эффективность бактериофага SA18 при лечении экспериментальной стафилококковой инфекции у мышей линии BALB/c. Инфекция и иммунитет. 2017;S:906. / Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Abaev IV. Effektivnost' bakteriofaga SA18 pri lechenii eksperimental'noi stafilokokkovoi infektsii u myshei linii BALB/s. Infektsiya i immunitet. 2017;S:906. (In Russian).
45. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Мякина ВП, Красильникова ВМ, Верёвкин ВВ, и др. Сравнительное изучение антибактериальной активности бактериофага PA5 и полимиксина на модели летальной синегнойной инфекции у мышей. Бактериология. 2019;4(1):34-43. / Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Myakinina VP, Krasilnikova VM, Verevkin VV, et al. Comparative study of antibacterial activities of bacteriophage PA5 and polymyxin on the model of lethal pseudomonas infection in mice. Bacteriology. 2019;4(1):34-43. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-34-43 (In Russian).
46. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Мякина ВП, Красильникова ВМ, Верёвкин ВВ, и др. Эффективность бактериофага Pm3 и ципрофлоксацина при лечении экспериментальной протейной инфекции у мышей. Бактериология. 2020;5(1):14-24. / Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Myakinina VP, Krasilnikova VM, Verevkin VV, et al. Effectiveness of bacteriophage Pm3 and ciprofloxacin in treating experimental proteus infections in mice. Bacteriology. 2020;5(1):14-24. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-14-24 (In Russian).
47. Борзилов АИ, Коробова ОВ, Комбарова ТИ, Денисенко ЕА, Верёвкин ВВ, Ганина ЕА, и др. Эффективность фаготерапии экспериментальной эшерихиозной инфекции у мышей. Бактериология. 2021;6(2):8-22. / Borzilov AI, Korobova OV, Kombarova TI, Denisenko EA, Verevkin VV, Ganina EA, et al. Phage therapy efficiency of experimental escherichiosis infection in mice. Bacteriology. 2021;6(2):8-22. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-2-8-22 (In Russian).
48. Volozhantsev NV, Borzilov AI, Shpirt AM, Krasilnikova VM, Verevkin VV, Denisenko EA, et al. Derived depolymerase (B-glucosidase) against *Klebsiella pneumoniae* capsular type K2. Virus Research. 2022;322:198951. DOI: 10.1016/j.virusres.2022.198951
49. Wang JL, Kuo CF, Yeh CM, Chen JR, Cheng MF, Hung CH. Efficacy of fkm18p phage therapy in a murine model of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection. Infect Drug Resist. 2018 Nov 15;11:2301-2310. DOI: 10.2147/IDR.S179701
50. Borzilov AI, Volozhantsev NV, Korobova OV, Kolupaeva LV, Pereskova ES, Kombarova TI, et al. Bacteriophage and Phage-Encoded Depolymerase Exhibit Antibacterial Activity Against K9-Type *Acinetobacter baumannii* in Mouse Sepsis and Burn Skin Infection Models. Viruses. 2025 Jan 6;17(1):70. DOI: 10.3390/v17010070
51. Wu M, Hu K, Xie Y, Liu Y, Mu D, Guo H, et al. A Novel Phage PD-6A3, and Its Endolysin Ply6A3, With Extended Lytic Activity Against *Acinetobacter baumannii*. Front Microbiol. 2019 Jan 9;9:3302. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03302
52. Wang Z, Yang X, Wang H, Wang S, Fang R, Li X, et al. Characterization and efficacy against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* of a novel Friunavirus phage from sewage. Front Cell Infect Microbiol. 2024 Apr 22;14:1382145. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1382145

Информация о соавторах:

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

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

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

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

Попова Анастасия Владимировна, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и гено-инженерных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

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

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

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

Elena A. Ganina, Researcher, Nanobiotechnology Laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Anastasia V. Popova, Senior Researcher, Molecular Diagnostics and Genetically Engineered Preparations Laboratory, Molecular Microbiology Department Federal State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Выбор антибактериальной терапии у детей с инфекциями мочевыводящих путей после аллогенной трансплантации трупной почки

А.В.Мартыненко^{1,2}, Н.И.Фёдорова², Е.А.Молчанова², Д.Б.Эктов², Р.Р.Галимов², Я.В.Панасюк¹,
Н.В.Власенко³, Н.В.Сычева³, А.В.Тутельян³, С.Н.Кузин¹

¹ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова», Москва, Российская Федерация;

²Российская детская клиническая больница, филиал ФГАУ «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова», Москва, Российская Федерация;

³ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация

Проблемой современной трансплантационной хирургии являются инфекции мочевыводящих путей (ИМВП). *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* – основные возбудители ИМВП после аллогенной трансплантации трупной почки (АТТП). Опасность инфекционных осложнений, вызванных бактериями – продуцентами β-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) состоит в резистентности возбудителей к β-лактамам антибиотикам.

Цель исследования. Изучить частоту выделения *E. coli*, *K. pneumoniae* после АТТП, оценить чувствительность выделенных штаммов к препаратам разных фармакологических групп, определить гены резистентности для подбора адекватной терапии.

Материалы и методы. Исследование проводило на базе Российской детской клинической больницы г. Москвы в отделении по пересадке почки в период с 01.2017 по 07.2020. В исследование были включены 103 ребенка в возрасте от 5 до 17 лет. Для исследования проводили забор мочи в ранние и отдаленные сроки после АТТП. Осуществляли определение чувствительности к противомикробным препаратам, генов резистентности металло-β-лактамаз VIM-, IMP-, NDM-типов и генов карбапенемаз KPC и OXA-48 типов методом полимеразной цепной реакции.

Результаты. За период с 01.2017 по 07.2020 исследовано 669 штаммов микроорганизмов. Бактериурию и развитие ИМВП регистрировали в 83 случаях. Выделено 27 клинически значимых штаммов *E. coli* и 31 штамм *K. pneumoniae*. У 29% исследуемых энтеробактерий выявлена продукция БЛРС. Определили эффективность разных групп антибиотиков в лечении ИМВП после АТТП.

Заключение. *E. coli* чаще встречалась у девочек, *K. pneumoniae* – у мальчиков. Около 29% выявленных энтеробактерий продуцировали БЛРС, 43% несли ген карбапенемазы OXA-48. Показано, что препараты первой линии лечения – карбапенемы, а низкоэффективные препараты в лечение ИМВП – препараты пенициллинового ряда.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, инфекция мочевыводящих путей, β-лактамазы расширенного спектра действия, карбапенемазы, антибиотики

Для цитирования: Мартыненко А.В., Фёдорова Н.И., Молчанова Е.А., Эктов Д.Б., Галимов Р.Р., Панасюк Я.В., Власенко Н.В., Сычева Н.В., Тутельян А.В., Кузин С.Н. Выбор антибактериальной терапии у детей с инфекциями мочевыводящих путей после аллогенной трансплантации трупной почки. Бактериология. 2025; 10(3): 19–25. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-19-25

Selection of antibacterial therapy in children with urinary tract infections after allogeneic cadaveric kidney transplantation

A.V.Martynenkova^{1,2}, N.I.Fedorova², E.A.Molchanova², D.B.Ektov², R.R.Galimov², Ya.V.Panasjuk¹,
N.V.Vlasenko³, N.V.Sycheva³, A.V.Tutelyan³, S.N.Kuzin¹

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

²Russian Children's Clinical Hospital, a branch of the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation;

³Central Research Institute of Epidemiology of Rosпотребнадзор, Moscow, Russian Federation

Urinary tract infections (UTIs) are a significant problem in modern transplant surgery. *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* are the main causative agents of UTIs after allogeneic cadaveric kidney transplantation (ACKT). The danger of infectious complications caused by bacteria producing extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) lies in the resistance of these pathogens to β-lactam antibiotics.

Для корреспонденции:

Мартыненко Алия Викторовна, биолог микробиологического отдела клинко-диагностической лаборатории Российской детской клинической больницы, филиал Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова

Адрес: 117997, Москва, Ленинский пр-т, 117
ORCID: 0000-0001-9047-6595

Статья поступила 09.04.2025, принята к печати 30.09.2025

For correspondence:

Aliya V. Martynenkova, Biologist of the Microbiological department of the Clinical diagnostic Laboratory, Russian Children's Clinical Hospital, a branch Pirogov Russian National Research Medical University

Address: 117 Leninsky ave., Moscow, 117997, Russian Federation
ORCID: 0000-0001-9047-6595

The article was received 09.04.2025, accepted for publication 30.09.2025

The aim. To study the frequency of *E. coli* and *K. pneumoniae* isolation after ACKT, assess the sensitivity of isolated strains to drugs from different pharmacological groups, and identify resistance genes to select adequate therapy.

Introduction. UTIs are a significant problem in modern transplant surgery. *K. pneumoniae* and *E. coli* are the main causative agents of UTIs after ACKT. The danger of infectious complications caused by bacteria producing ESBLs lies in the resistance of these pathogens to β -lactam antibiotics.

Materials and methods. The study was conducted at the Russian Children's Clinical Hospital in Moscow. Specifically, it took place in the kidney transplant department from January 2017 to July 2020. The study included 103 children aged 5 to 17 years. Urine samples were collected in the early and late stages after transplantation. Antimicrobial drug sensitivity, metallo- β -lactamase resistance genes (VIM, IMP, and NDM types), and carbapenemase genes (KPC and OXA-48 types) were determined using the PCR method.

Results. During the period from January 2017 to July 2020, 669 strains of microorganisms were studied. Bacteriuria and the development of UTI were recorded in 83 cases. Twenty-seven clinically significant strains of *E. coli*, and 31 strains of *K. pneumoniae* were isolated. BLES production was detected in 29% of the studied enterobacteria. The effectiveness of the antibiotic groups in the treating of UTIs after ACKT was determined.

Conclusion. *E. coli* was more common in girls, while *K. pneumoniae* was more common in boys. Approximately 29% of the detected enterobacteria produced ESBLs, and 43% carried the OXA-48 carbapenemase gene. This study showed that carbapenems are first-line drugs for treatment, whereas penicillin drugs have low efficacy in treating UTIs.

Key words: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, urinary tract infection, extended spectrum β -lactamase, carbapenemase, antibiotics

For citation: Martynenkova A.V., Fedorova N.I., Molchanova E.A., Ektov D.B., Galimov R.R., Panasyuk Ya.V., Vlasenko N.V., Sycheva N.V., Tutelyan A.V., Kuzin S.N. Selection of antibacterial therapy in children with urinary tract infections after allogeneic cadaveric kidney transplantation. Bacteriology. 2025; 10(3): 19–25. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-19-25

Трансплантация почки является наиболее эффективным методом лечения терминальной стадии хронической почечной недостаточности (ХПН) у детей. Качество жизни детей с функционирующим почечным трансплантатом значительно выше, чем у детей, получающих терапию диализом [1]. По данным европейского регистра ERA-EDTA (European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association) за 2015 г., пятилетняя выживаемость пациентов, в зависимости от вида заместительной почечной терапии, при гемодиализе или перитонеальном диализе составляет 41,8%, при трансплантации трупной почки – 88%, при трансплантации почки от живого донора – 94,1%. При этом тот же показатель у пациентов с почечным трансплантатом от трупного донора оценивается в 78,9%, от живого – в 87,4% [2]. По данным того же регистра, эффективность пересадки почки максимальна у пациентов, оперированных в детском и подростковом возрасте (от 0 до 19 лет), их прогнозируемая продолжительность жизни составляет ~60–65 лет [3].

В настоящее время данные приживаемости аллотрансплантатов также улучшились с появлением новых иммуносупрессивных препаратов и разработкой адекватной схемы лечения пациента после аллогенной трансплантации трупной почки (АТТП) [4]. Но применение иммуносупрессии, с другой стороны, может увеличивать риск инфекционных осложнений после трансплантации почки [5–8].

Инфекция после АТТП является одной из основных причин смерти, что составляет 24–56% случаев [9]. Одним из частых осложнений является инфекция мочевыводящей системы (ИМВП). Существует несколько вариантов возникновения ИМВП:

- в первые месяцы после АТТП возможна передача от донора к реципиенту в случае, если причиной смерти являлась бактериальная инфекция либо сопутствующая бактериальная инфекция на фоне основного заболевания;
- инфекционное заболевание самого реципиента, которое проявилось на фоне посттрансплантационной терапии;
- колонизация пациентов, ожидающих трансплантацию, внутрибольничными штаммами микроорганизмов, устойчивыми к противомикробным препаратам [10–16].

Энтеробактерии являются наиболее частыми возбудителями ИМВП у больных после АТТП. Лидирующее положение занимает *Escherichia coli*, которая выявляется более чем у половины пациентов, на втором месте – *Klebsiella pneumoniae* [17, 18].

Опасность инфекционных осложнений, вызванных бактериями – продуцентами β -лактамаз, заключается не только в резистентности возбудителей к β -лактамам антибиотикам, но и в сопутствующей устойчивости к другим классам антибактериальных препаратов (фторхинолонам, аминогликозидам, иногда – ко-тримоксазолу), что нередко определяет клиническую неэффективность лечения и повышает риск неблагоприятного исхода у пациента.

Известно, что антибиотикорезистентность имеет генетическую основу. Она подразделяется на видоспецифичную – постоянную характеристику, основанную на строении клеточной стенки, органоидов клетки, и приобретенную – возникающую вследствие горизонтального переноса генов. При этом бактериальная стенка может стать непроницаемой для антибиотика, проникновение которого в клетку должно происходить путем активного транспорта. Поступивший препарат может быть инактивирован или связан, метаболизм микроба может переключиться на альтернативный путь, минуя реакции, заблокированные антибиотиком.

Лекарственная мультирезистентность грамотрицательных бактерий является серьезной проблемой клинической трансплантации и современной медицины в целом. Мультирезистентность у многих грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и др.) определяется возможностью продукции этими микроорганизмами β -лактамаз – ферментов, определяющих устойчивость бактерий практически ко всем β -лактамам антибиотикам. В ряде современных работ показано, что на долю *E. coli*, продуцирующих β -лактамазы расширенного спектра (БЛРС), приходится около 35% от всех штаммов кишечной палочки [19, 20]. Отмечается увеличение числа энтеробактерий, продуцирующих металло- β -лактамазы, выделенных от пациентов после трансплантации почки, среди них NDM-продуцирующие штаммы *K. pneumoniae* достигают 13% [6, 19–21].

Цель исследования. Изучить частоту выделения *E. coli* и *K. pneumoniae* и оценить чувствительность выделенных штаммов к антибактериальным препаратам разных фармакологических групп с определением генов резистентности у детей с ИМВП после АТПП.

Материалы и методы

Данное исследование проведено на базе Российской детской клинической больницы – филиал ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И.Пирогова» г. Москвы (одобрено Комитетом по био-медицинской этике Российской детской клинической больницы, протокол №23 от 17.09.2024).

Исследуемую группу составили 103 пациента, которым в период с января 2017 г. по июль 2020 г. выполнено 116 АТПП (АТПП) с удовлетворительной функцией почечного трансплантата, 13 пациентам были выполнены повторные трансплантации почек в связи с неудовлетворительной функцией трансплантата. Возраст пациентов составил от 5 до 17,4 года (средний возраст $11,2 \pm 2,78$) из них 40 (41,2%) девочек и 63 (58,8%) мальчика.

У всех пациентов была диагностирована хроническая почечная недостаточность (ХПН) в терминальной стадии. Причинами ХПН служили как врожденные генетические патологии (врожденная гипоплазия почек, синдром Альпорта, пузырно-мочеточниковый рефлюкс, фокально-сегментарный гломерулосклероз, поликистоз, дисплазия, двусторонний уретерогидронефроз и прочие врожденные аномалии развития мочеполовой системы), так и приобретенные (хронический пиелонефрит, нефротический синдром неясной этиологии, травмы, осложнения после острых кишечных инфекций, огнестрельные ранения и прочее). В исследовании участвовало 74 ребенка с врожденной патологией заболевания почек и 29 детей с приобретенной патологией. Заместительная терапия проводилась 98 пациентам в виде перитонеального диализа или гемодиализа, 5 пациентам на момент поступления и до трансплантации почки заместительная терапия не требовалась.

Исследуемый материал: моча, взятая в первые сутки после трансплантации почки с помощью уретрального катетера. Согласно протоколу исследования, следующее взятие мочи осуществляли через неделю и через месяц после трансплантации почки. В случае клинических проявлений ИМВП забор мочи производили каждые три дня для регистрации изменений в составе микрофлоры.

Микробиологическому исследованию подлежала средняя порция мочи. Посев осуществляли на плотные питательные среды с количественной оценкой степени бактериурии и

просмотром чашек Петри через 24 и 48 ч. Посев мочи производили на следующие питательные среды:

- Uriselect 4 (Bio-Rad Laboratories, США) – питательная хромогенная среда для выделения, дифференциации и количественного учета микроорганизмов, вызывающих инфекции мочевыводящих путей;
- кровяной агар (Becton Dickinson, США) – для выделения и культивирования широкого спектра микроорганизмов;
- агар Сабуро с хлорамфениколом (BioMerieux, Франция) – для выделения, культивирования и хранения различных сапрофитных и патогенных грибов, включая дрожжеподобные грибы рода *Candida*;
- агар МакКонки (Bacten Dickinson, США) – для выборочного выделения и идентификации грамотрицательных палочек, в т.ч. энтеробактерий.

Идентификацию проводили методом MALDI-TOF MS VITEK MS (BioMerieux, Франция).

Клинически значимыми считали микроорганизмы, выделенные в концентрации не менее 10^4 КОЕ/мл и при условии выделения либо монокультуры, либо в ассоциации не более чем с одним микроорганизмом. Из исследования исключали штаммы, если у пациента отсутствовали клинические проявления ИМВП. При выявлении этиологически значимого агента осуществляли определение чувствительности к противомикробным препаратам на микробиологическом анализаторе PHOENIX (Becton Dickinson, США). Оценивали чувствительность к 6 основным антибиотикам (табл. 1).

Определение генов резистентности осуществляли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с помощью набора реагентов для выявления генов металло-β-лактамаз групп VIM, IMP и NDM «АмплиСенс MDR MBL-FL» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия) и набора для выявления генов карбапенемаз групп KPC и OXA-48 «АмплиСенс MDR KPC/OXA-48-FL» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия). Амплификацию проводили на 5-канальном детектирующем амплификаторе «ДТ прайм» (ООО «НПО ДНК-технологии», Россия).

Статистическую обработку данных проводили при помощи компьютерной программы для статистического анализа Statistica 12.0 и программы Microsoft Excel 2010. Были использованы методы описательной статистики с определением частоты встречаемости признака, среднего арифметического, медианы и стандартного отклонения (SD).

Результаты исследования

За период с января 2017 г. по июль 2020 г. из мочи в послеоперационном периоде (от суток до 3 мес.) у обследо-

Таблица 1. Основные антибактериальные препараты по фармакологическим группам
Table 1. Main antibacterial drugs by pharmacological groups

Название антибиотика / Name of the antibiotic	Фармакологическая группа / Pharmacological group	
Ампициллин / Ampicillin (AMP)	Пенициллины / Penicillins	β-лактамы препараты / β-lactam drugs
Имипенем / Imipenem (IMP)	Карбапенемы / Carbapenems	
Цефтазидим / Ceftazidime (CAZ)	Цефалоспорины / Cephalosporins	Защищенные цефалоспорины / Protected cephalosporins
Цефтазидим-авибактам / Ceftazidime-avibactam (CZA)	Защищенные цефалоспорины / Protected cephalosporins	
Ципрофлоксацин / Ciprofloxacin (CIP)	Фторхинолоны / Fluoroquinolones	Тетрациклины / Tetracyclines
Тетрациклин / Tetracycline (TE)	Тетрациклины / Tetracyclines	

ванных пациентов после трансплантации почки было выделено 669 микроорганизмов. Клинически значимой концентрацией для исследования и лечения ИМВП с подтвержденной клиникой считали концентрацию 10^4 КОЕ/мл и более. Бактериурию и развитие ИМВП регистрировали в 83 случаях, у девочек встречалась чаще, чем у мальчиков: в 45 и в 38 случаях соответственно.

Большинство штаммов не учитывали в работе и учете результатов, так как в образце было выявлено 3 и более микроорганизмов, что считалось контаминацией материала и требовало повторного исследования. Также в нашем исследовании не учитывали микроорганизмы, концентрация которых была менее 10^3 и по клинической картине не наблюдали признаки ИМВП.

При оценке результатов выделенные микроорганизмы были разделены на несколько групп: грамположительные бактерии ($n = 323$), неферментирующие грамотрицательные бактерии ($n = 81$), энтеробактерии ($n = 204$) и грибы ($n = 27$).

Среди грамположительных бактерий чаще всего выделяли *Enterococcus faecalis* (35,5%), *Enterococcus faecium* (14,2%) и *Staphylococcus haemolyticus* (12%). У грамотрицательных бактерий лидировали представители семейства *Enterobacteriaceae*, а именно *K. pneumoniae* (30,8%) и *E. coli* (31,9%). Реже встречались представители неферментирующих грамотрицательных бактерий, среди которых *P. aeruginosa* занимала 60,5%. Грибы в 41% были представлены *Candida albicans*.

Проводимое исследование включало в себя выявление, учет и проведение контроля у пациентов с ИМВП, вызванных *E. coli*, *K. pneumoniae*.

С 2017 по 2020 г. из исследуемых образцов *E. coli* была выявлена в 45 образцах мочи (18 случаев у мальчиков и 27 у девочек), из них в исследование вошло 27 этиологически значимых штаммов, а *K. pneumoniae* было выявлено 38 штаммов (20 штаммов от мальчиков и 18 от девочек). Из них 31 штамм был расценен как этиологически значимый: концентрация более 10^4 КОЕ/мл, наличие бактерий в общем анализе мочи, клинические проявления ИМВП, высокий уровень С-реактивного белка (СРБ).

По результатам исследования у мальчиков ведущим этиологическим агентом была *K. pneumoniae*, в то время как *E. coli* преобладала в группе девочек. На рис. 1 показано соотношение количества выделенных микроорганизмов у мальчиков и девочек.

У одного пациента микрофлора мочи не менялась, несмотря на проведение широкомасштабной операции. Рост *E. coli* с идентичной антибиотикограммой был получен как до трансплантации почки, так и в послеоперационном периоде в количестве до 10^3 . Данный штамм был расценен нами как не имеющий этиологического значения. В связи с отсутствием клинических и лабораторных проявлений ИМВП пациенту была назначена поддерживающая, профилактическая терапия.

Определение чувствительности выделенных штаммов к противомикробным препаратам играет важную роль в назначении адекватной антибактериальной терапии при развитии ИМВП в предупреждении развития инфекционных осложнений и в проведении мониторинга за уровнем распространения резистентных штаммов.

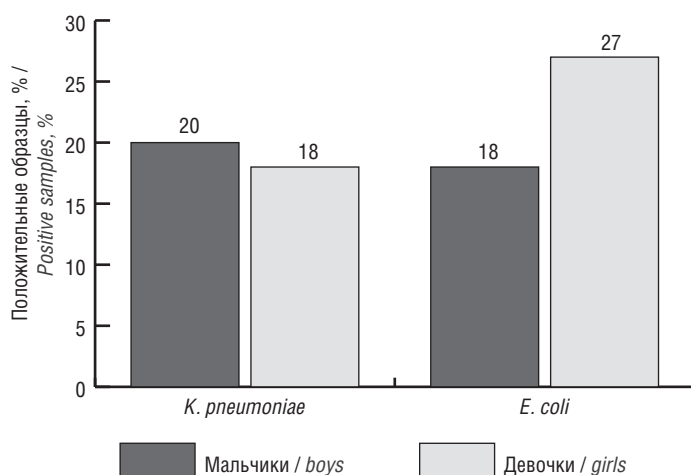


Рис. 1. Обнаружение *K. pneumoniae* и *E. coli* в образцах мочи при АТТП у детей в зависимости от пола.

Fig. 2. Detection of *K. pneumoniae* and *E. coli* in urine samples in children with ATTP depending on gender.

У выявленных штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* определяли чувствительность к 15 основным антибиотикам разных фармакологических групп. В ходе исследования определяли эффективность следующих фармакологических групп антибиотиков в лечении ИМВП после АТТП: фторхинолоны (ципрофлоксацин), тетрациклины (тетрациклин), β -лактамы (пенициллин), карбапенемы (имипенем), цефалоспорины (цефтазидим, цефтазидим/авибактам).

Среди маркеров резистентности фенотипическим методом определяли продукцию БЛРС. У 29% энтеробактерий по результатам исследования регистрировали продукцию БЛРС. Генотипическим методом определяли гены продукции карбапенемазы. По итогам исследования ген карбапенемазы ОХА-48 выявлялся наиболее часто – 43% из всех выделенных карбапенем-резистентных штаммов. Данные по остальным генам карбапенемазы (KPC, ОХА-48, VIM, NDM, IMP) представлены на рис. 2.

Быстрое определение генов и механизмов резистентности возбудителей имело большое значение для формирования дальнейшей тактики лечения пациентов с ИМВП. Полирезистентная *K. pneumoniae* была выявлена в 1% случаев за все время нашего исследования, штамм был устойчив ко всем препаратам в изучаемых нами группах: пенициллинам, цефалоспорином, фторхинолонам и тетрациклинам. К препаратам цефалоспоринового ряда штаммы *E. coli* были

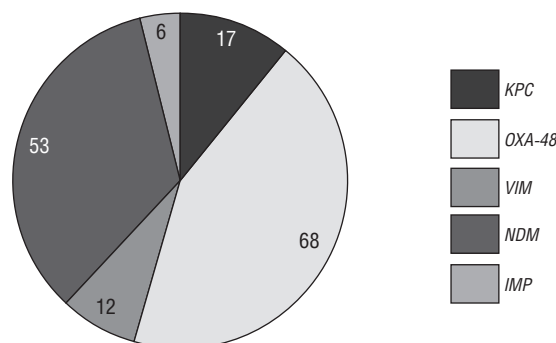


Рис. 2. Типы карбапенемаз, выявляемые у энтеробактерий.

Fig. 2. Types of carbapenemases detected in enterobacteria.

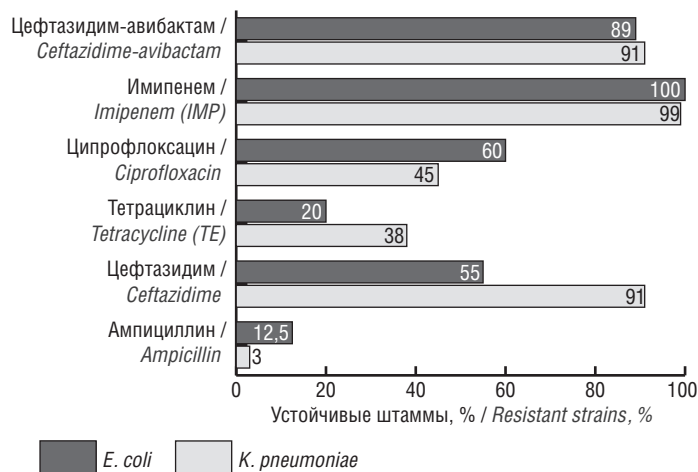


Рис. 3. Резистентность выделенных штаммов к основным антибактериальным препаратам, %.

Fig. 3. Resistance of isolated strains to the main antibacterial drugs, %.

чувствительны в 55% случаев, в то время как *K. pneumoniae* – в 75%, причем исследуемые культуры *E. coli* и *K. pneumoniae* сохраняли чувствительность в 89 и 91% случаев к препарату цефтазидим/авибактам соответственно.

Активность препаратов группы фторхинолонов по отношению к *E. coli* и *K. pneumoniae* составила 60 и 45% соответственно, а чувствительность к препаратам тетрациклинового ряда составила 20 и 38% случаев среди выявленных штаммов.

Высокая резистентность штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* проявилась к препаратам пенициллинового ряда – 88 и 97% случаев соответственно (рис. 3).

K. pneumoniae по сравнению с *E. coli* проявляла более высокую степень устойчивости к антимикробным препаратам.

Обсуждение

В нашем исследовании анализ полученных данных проводили из образцов биологического материала, доставленного в разные послеоперационные периоды, от суток до нескольких месяцев, года. Подавляющая часть ИМВП была зафиксирована в ранний послеоперационный период, что могло быть связано с наличием послеоперационных ран, возможной передачей инфекции от донора к реципиенту, наличием скрытых инфекций, в т.ч. и ИМВП, потребностью в проведении иммуносупрессивной терапии, а также длительным нахождением уретральных катетеров. Но Z. Mathe et al. [22] отмечали, что установка мочеточниковых стентов не увеличивает частоту инфекционных осложнений мочевыводящих путей, что в целом подтверждает наше исследование: наличие катетеров и стентов не приводило к возникновению инфекции ввиду того, что исключалось их длительное нахождение. Сбор материала в первые сутки после операции проводили с помощью установленного катетера, и, как правило, все полученные образцы оставались стерильными, что и дает нам право сделать вывод о том, что нахождение стентов и катетеров не влияет на образование инфекционных осложнений в ранний послеоперационный период, но не исключает того факта, что при более длительном нахождении возможен риск возникновения инфекционного осложнения.

Нередко возбудителями в ранний послеоперационный период являются грамотрицательные микроорганизмы, характерные для данного учреждения, такие как *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Proteus* spp. [21, 23, 24]. В нашем случае возбудителем в ранний послеоперационный период преимущественно являлась *K. pneumoniae* – основной возбудитель внутрибольничной инфекции, вне зависимости от получаемой иммуносупрессивной терапии. Всемирная организация здравоохранения в 2017 г. обозначила *K. pneumoniae*, продуцирующие БЛРС, как одну из наиболее опасных супербактерий [25, 26]. В нашем исследовании документировано выделение полирезистентной *K. pneumoniae* в 1% случаев.

При обнаружении значимой бактериурии назначали стартовую эмпирическую терапию для лечения ИМВП после АТПП. В качестве препаратов первой линии рассматривали карбапенемы, либо цефалоспорины III поколения. Существует мнение, что нет систематических данных по антибиотикотерапии у детей после трансплантации почки [27]. При этом описывается терапия фторхинолонами как альтернатива использования цефтазидима и амикацина, иногда совместно с гентамицином. Однако с учетом нефротоксичности последнего использование его не рекомендуется для лечения бактериальной инфекции. Сравнивая наши данные по проведению лечения фторхинолонами, можно с уверенностью сказать, что данный препарат может применяться в том случае, если данный антибиотик был подобран согласно полученному микробиологическому исследованию, но не как препарат выбора эмпирической терапии. Также важно правильно определять минимальные подавляющие концентрации препаратов для выделенных штаммов, в первую очередь для *K. pneumoniae*. При получении данных бактериологического исследования схему лечения корректировали либо продолжали в случае верной изначальной тактики лечения.

Стоит отметить, что на данный момент опубликовано довольно много литературы, касающейся обследования взрослых пациентов после трансплантации почки на наличие бактериальных инфекций, но научной литературы, описывающей бактериальные инфекции, мультирезистентные и полирезистентные штаммы *K. pneumoniae*, изучение генов резистентности, подбор по генам адекватной терапии, с учетом полученных результатов генотипических исследований у пациентов детского возраста после трансплантации почки, крайне мало. Учитывая современную проблематику в подборе адекватной и своевременной антибиотикотерапии, требуется более подробное исследование на предмет проведения мониторинга полученных штаммов у детей после АТПП, во избежание трансформации чувствительных штаммов в категорию резистентных, а также изучение влияния уже сформировавшейся резистентности на полученные штаммы представителей семейства *Enterobacterales*.

Заключение

За время исследования всех полученных образцов в ранний и отдаленный послеоперационные периоды (от суток до полугода) было выявлено 58 случаев ИМВП, вызванных представителями семейства *Enterobacterales*, а именно

E. coli (27) и *K. pneumoniae* (31). Преимущественно у *K. pneumoniae* отмечали развитие устойчивости к антибиотическим препаратам, что требовало смены эмпирической (стартовой) терапии.

По результатам исследования бактериурия у мальчиков регистрировалась реже, чем у девочек, особенно в ранний послеоперационный период, что подтверждает тот факт, что частота развития ИМВП зависит от пола ребенка за счет анатомо-физиологической особенности женского организма.

При изучении поступающих образцов мочи, полученных от обследуемых детей в ранний и отдаленный послеоперационные периоды, *E. coli* чаще встречалась у девочек, а *K. pneumoniae* – у мальчиков, где *K. pneumoniae* являлась частым возбудителем внутрибольничных ИМВП с вероятной способностью развития полирезистентных штаммов. А *E. coli* являлась частым возбудителем у детей, которые прибывали на катамнезное обследование спустя полгода и более, что дает нам право сделать вывод, что *E. coli* является возбудителем внебольничных ИМВП.

У 29% выявленных энтеробактерий регистрировали продукцию БЛРС. По итогам исследования ген ОХА-48 выявлялся у 43% от всех выделенных карбапенем-резистентных штаммов).

Выбор стартовой терапии для лечения ИМВП необходимо формировать при помощи локальных эпидемиологических данных. При развитии ИМВП у детей после трансплантации почки в качестве препаратов первой линии при эмпирической терапии рассматриваются карбапенемы, проявившие высокую активность в отношении выделенных штаммов. Цефалоспорины III поколения в подавляющем большинстве случаев могут оказаться неэффективны.

Для корректировки терапии параллельно проводится выявление генов резистентности полученного возбудителя для более точного назначения антибиотика, а также возможного подключения препарата другой фармакологической группы с целью усиления действия эффективности лечения ИМВП. Каждый препарат подбирается с учетом полученного гена, чаще всего это комбинации препаратов защищенных цефалоспоринов с карбапенемами, в случае мультирезистентных штаммов.

Своевременная и правильно подобранная антибиотикотерапия с применением современных генотипических и фенотипических методов исследования полученной микрофлоры позволяет предотвратить тяжелые виды ИМВП с последующим поражением трансплантируемого органа.

Литература / References

1. Offner G, Latta K, Hoyer PF, Baum HJ, Ehrich JH, Pichlmayr R, et al. Kidney transplanted children come of age. *Kidney Int.* 1999 Apr;55(4):1509-17. DOI: 10.1046/j.1523-1755.1999.00356.x
2. Kramer A, Pippias M, Noordzij M, Stel VS, Afentakis N, Ambühl PM, et al. The European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA) Registry Annual Report 2015: a summary. *Clin Kidney J.* 2018 Feb;11(1):108-122. DOI: 10.1093/ckj/sfx149
3. Томилина НА, Андрусов АМ, Перегудова НГ, Шинкарев МБ. Заместительная терапия терминальной хронической почечной недостаточности в Российской Федерации в 2010–2015 гг. Отчет по данным Общероссийского регистра заместительной почечной терапии Российского диализного общества.

- Часть 1. Нефрология и диализ. 2017;19(4: Приложение):1-95. / Tomilina NA, Andrushev AM, Peregudova NG, Shinkarev MB. Renal replacement therapy for End Stage Renal Disease in Russian Federation, 2010–2015. Russian National Renal Replacement Therapy Registry Report of Russian Public Organization of Nephrologists «Russian Dialysis Society». Part 1. *Nefrologiya I Dializ.* 2017;19(4: Supplement):1-95. DOI: 10.28996/1680-4422-2017-4suppl-1-95 (In Russian).
4. Шишло АА, Горайнов ВА, Каабак ММ. Трансплантация почки у детей. *Хирургия.* 2008;6:58-62. / Shishlo AA, Goryainov VA, Kaabak MM. Kidney transplantation in children. *Surgery.* 2008;6:58-62. (In Russian).
 5. Ashraf HS, Khan MU, Hussain I, Hyder I. Urological complications in ureteric stenting live related renal transplantation. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2011 Jan;21(1):34-6.
 6. Vidal E, Torre-Cisneros J, Blanes M, Montejo M, Cervera C, Aguado JM, et al. Bacterial urinary tract infection after solid organ transplantation in the RESITRA cohort. *Transpl Infect Dis.* 2012 Dec;14(6):595-603. DOI: 10.1111/j.1399-3062.2012.00744.x
 7. Parapiboon W, Ingsathit A, Jirasiritham S, Sumethkul V. High incidence of bacteriuria in early post-kidney transplantation; results from a randomized controlled study. *Transplant Proc.* 2012 Apr;44(3):734-6. DOI: 10.1016/j.transproceed.2012.03.033
 8. Fortun J, Martin-Davila P, Pascual J, Cervera C, Moreno A, Gavalda J, et al. Transplant Network. Immunosuppressive therapy and infection after kidney transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2010 Oct;12(5):397-405. DOI: 10.1111/j.1399-3062.2010.00526.x
 9. Charfeddine K, Zaghdien S, Kharrat M, Kamoun K, Jarraya F, Hachicha J. Infectious complications in kidney transplant recipients: a single-center experience. *Transplant Proc.* 2005 Jul-Aug;37(6):2823-5. DOI: 10.1016/j.transproceed.2005.05.009
 10. Alangaden GJ, Thyagarajan R, Gruber SA, Morawski K, Garnick J, El-Amm JM, et al. Infectious complications after kidney transplantation: current epidemiology and associated risk factors. *Clin Transplant.* 2006 Jul-Aug;20(4):401-9. DOI: 10.1111/j.1399-0012.2006.00519.x
 11. Gupta RK. Opportunistic infections in renal allograft recipients. *Transplant Proc.* 2007 Apr;39(3):731-3. DOI: 10.1016/j.transproceed.2007.01.063
 12. Kosmadakis G, Daikos GL, Pavlopoulou ID, Gobou A, Kostakis A, Tzanatou-Exarchou H, et al. Infectious complications in the first year post renal transplantation. *Transplant Proc.* 2013 May;45(4):1579-83. DOI: 10.1016/j.transproceed.2012.10.047
 13. Linares L, Cofán F, Cervera C, Ricart MJ, Oppenheimer F, Campistol JM, et al. Infection-related mortality in a large cohort of renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2007 Sep;39(7):2225-7. DOI: 10.1016/j.transproceed.2007.07.047
 14. Maraha B, Bonten H, van Hooff H, Fiolet H, Buiting AG, Stobberingh EE. Infectious complications and antibiotic use in renal transplant recipients during a 1-year follow-up. *Clin Microbiol Infect.* 2001 Nov;7(11):619-25. DOI: 10.1046/j.1198-743x.2001.00329.x
 15. Sousa SR, Galante NZ, Barbosa DA, Pestana JO. Incidence of infectious complications and their risk factors in the first year after renal transplantation. *J Bras Nefrol.* 2010 Mar;32(1):75-82. (English, Portuguese).
 16. Veroux M, Giuffrida G, Corona D, Gagliano M, Scriffignano V, Vizcarra D, et al. Infective complications in renal allograft recipients: epidemiology and outcome. *Transplant Proc.* 2008 Jul-Aug;40(6):1873-6. DOI: 10.1016/j.transproceed.2008.05.065
 17. Ak O, Yildirim M, Kucuk HF, Gencer S, Demir T. Infections in renal transplant patients: risk factors and infectious agents. *Transplant Proc.* 2013 Apr;45(3):944-8. DOI: 10.1016/j.transproceed.2013.02.080
 18. Silva C, Afonso N, Macário F, Alves R, Mota A. Recurrent urinary tract infections in kidney transplant recipients. *Transplant Proc.* 2013 Apr;45(3):1092-5. DOI: 10.1016/j.transproceed.2013.02.019
 19. Azap Ö, Togan T, Yesilkaya A, Arslan H, Haberal M. Antimicrobial susceptibilities of uropathogen *Escherichia coli* in renal transplant recipients: dramatic increase in

- ciprofloxacin resistance. Transplant Proc. 2013 Apr;45(3):956-7. DOI: 10.1016/j.transproceed.2013.03.006
20. Cicora F, Mos F, Paz M, Allende NG, Roberti J. Infections with blaKPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in renal transplant patients: a retrospective study. Transplant Proc. 2013 Nov;45(9):3389-93. DOI: 10.1016/j.transproceed.2013.07.064
21. Pellé G, Vimont S, Levy PP, Hertig A, Ouali N, Chassin C, et al. Acute pyelonephritis represents a risk factor impairing long-term kidney graft function. Am J Transplant. 2007 Apr;7(4):899-907. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2006.01700.x
22. Mathe Z, Treckmann JW, Heuer M, Zeiger A, Sauerland S, Witzke O, et al. Stented ureterovesical anastomosis in renal transplantation: does it influence the rate of urinary tract infections? Eur J Med Res. 2010;15(7):297-302. DOI: 10.1186/2047-783x-15-7-297
23. Fiorentino M, Pesce F, Schena A, Simone S, Castellano G, Gesualdo L. Updates on urinary tract infections in kidney transplantation. J Nephrol. 2019 Oct;32(5):751-761. DOI: 10.1007/s40620-019-00585-3
24. Valera B, Gentil MA, Cabello V, Fijo J, Cordero E, Cisneros JM. Epidemiology of urinary infections in renal transplant recipients. Transplant Proc. 2006 Oct;38(8):2414-5. DOI: 10.1016/j.transproceed.2006.08.018
25. WHO releases list of world's most dangerous superbugs [Electronic resource]. Available at: <https://www.statnews.com/2017/02/27/who-list-bacteria-antibiotic-resistance/> (accessed 13.05.2025).
26. Хаертынов ХС, Анохин ВА, Ризванов АА, Давидюк ЮН, Халиуллина СВ, Любин СА, и др. Вирулентность и антибиотикорезистентность изолятов *Klebsiella pneumoniae* у новорожденных с локализованными и генерализованными формами клебсиеллезной инфекции. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2018;63(5):139-146. / Khaertynov KhS, Anohin VA, Rizvanov AA, Davidyuk YuN, Khaliullina SV, Lyubin SA, et al. Virulence and antibiotic resistance of isolates of *Klebsiella pneumoniae* in newborns with localized and generalized forms of infection. Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii (Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics). 2018;63(5):139-146. DOI: 10.21508/1027-4065-2018-63-5-139-146 (In Russian).
27. John U, Kemper MJ. Urinary tract infections in children after renal transplantation. Pediatr Nephrol. 2009 Jun;24(6):1129-36. DOI: 10.1007/s00467-007-0690-0

Информация о соавторах:

Фёдорова Наталья Игоревна, врач-бактериолог микробиологического отдела клиничко-диагностической лаборатории Российской детской клинической больницы, филиала Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
ORCID: 0000-0001-6244-4182

Молчанова Елена Александровна, врач-нефролог хирургического отделения по пересадке почки Российской детской клинической больницы, филиала Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
ORCID: 0000-0002-3496-855

Этков Денис Борисович, врач – детский хирург хирургического отделения по пересадке почки Российской детской клинической больницы, филиала Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
ORCID: 0000-0001-5676-1587

Галимов Руслан Радикович, врач клинической лабораторной диагностики клиничко-диагностической лаборатории Российской детской клинической больницы, филиала Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
ORCID: 0009-0001-1230-092X

Панасюк Ярина Васильевна, ведущий специалист лаборатории молекулярной биотехнологии НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова
ORCID: 0000-0002-9335-4953

Власенко Наталья Викторовна, научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Сычева Наталья Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-8557-6540

Тутельян Алексей Викторович, академик РАН, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-2706-6689

Кузин Станислав Николаевич, профессор, доктор медицинских наук, ведущий специалист лаборатории молекулярной биотехнологии НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова

Information about co-authors:

Natalia I Fedorova, Bacteriologist of the Microbiological department of the Clinical diagnostic Laboratory, Russian Children's Clinical Hospital, a branch of the Pirogov Russian National Research Medical University
ORCID: 0000-0001-6244-4182

Elena A. Molchanova, Nephrologist Kidney Transplant Surgery Department Russian Children's Clinical Hospital, a branch of the Pirogov Russian National Research Medical University
ORCID: 0000-0002-3496-855

Denis B. Ektov, Pediatric surgeon Kidney Transplant Surgery Department Russian Children's Clinical Hospital, a branch of the Pirogov Russian National Research Medical University
ORCID: 0000-0001-5676-1587

Ruslan R. Galimov, Doctor of clinical laboratory diagnostics at the Clinical Diagnostic Laboratory Department Russian Children's Clinical Hospital, a branch of the Pirogov Russian National Research Medical University
ORCID: 0009-0001-1230-092X

Yarina V. Panasyuk, leading specialist of the laboratory of molecular biotechnology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
ORCID: 0000-0002-9335-4953

Natalya V. Vlasenko, Researcher, Laboratory of Viral hepatitis Central Research Institute of Epidemiology of Rosпотребнадзор

Natalia V. Sycheva, Junior Researcher, laboratory of healthcare-associated infections, Central Research Institute of Epidemiology of Rosпотребнадзор
ORCID: 0000-0001-8557-6540

Alexey V. Tutelyan, Academician of the Russian Academy of Sciences, MD, PhD, DSc, Head of the Laboratory of Health Care Associated Infections, Central Research Institute of Epidemiology of Rosпотребнадзор
ORCID: 0000-0002-2706-6689

Stanislav N. Kuzin, MD, PhD, DSc, professor, leading specialist of the laboratory of molecular biotechnology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera

Влияние pH-стресса на спектры жирных кислот штаммов *Vibrio cholerae*

Е.С.Шипко, О.В.Дуванова, Р.В.Писанов, В.Д.Кругликов

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

Цель. Изучить спектры жирных кислот штаммов *Vibrio cholerae* разной эпидемической значимости, выделенных из различных источников, в условиях кислотного и щелочного стрессов.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы *V. cholerae* O1, O139 и nonO1/nonO139 серогрупп (ctxAB⁺tcpA⁺, ctxAB⁺tcpA⁻). Для моделирования кислотного/щелочного стресса в условиях *in vitro* штаммы инкубировали в жидкой питательной среде с добавлением соляной, уксусной кислот и щелочи до pH 4,0–11,5. Из клеток получали препараты жирных кислот и анализировали методом газовой хромато-масс-спектрометрии на приборе «Маэстро 2-7802» («ИнтерЛаб», Москва) при помощи коммерческой библиотеки масс-спектров NIST17.

Результаты. При анализе спектров жирных кислот были выявлены отличия в ответной реакции на краткосрочный кислотный стресс у клинических штаммов и штаммов, выделенных из воды поверхностных водоемов: клинические штаммы активировали механизм cis/trans-изомеризации ненасыщенных жирных кислот, тогда как водные повышали сатурацию фосфолипидов. В то же время в условиях пролонгированного умеренного кислотного стресса у всех штаммов, взятых в исследование, детектированы аналогичные реакции: увеличение ненасыщенности мембранных липидов и циклизация ацильных цепей. Под воздействием щелочного стресса у штаммов *V. cholerae* независимо от объекта выделения наблюдалось появление trans-изомеров моноеновых и диеновых жирных кислот, синтез разветвленных, циклопропановых и гидроксикислот. Помимо изменений в жирно-кислотном составе, в условиях pH-стресса отмечен синтез сахаров, аминов, спиртов, амидов жирных кислот и некоторых вторичных метаболитов, возможно, играющих протективную роль.

Заключение. Специфические изменения в липидоме и метаболоме клетки в ответ на изменения pH среды могут увеличивать адаптационный/персистентный потенциал холерного вибриона, способствуя сохранению возбудителя в объектах окружающей среды и в организме человека.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, жирные кислоты, кислотный стресс, щелочной стресс

Для цитирования: Шипко Е.С., Дуванова О.В., Писанов Р.В., Кругликов В.Д. Влияние pH-стресса на спектры жирных кислот штаммов *Vibrio cholerae*. Бактериология. 2025; 10(3): 26–32. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-26-32

The effect of pH stress on the fatty acid spectra of *Vibrio cholerae* strains

E.S.Shipko, O.V.Duvanova, R.V.Pisanov, V.D.Kruglikov

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation

Goal. To study the spectra of fatty acids of *Vibrio cholerae* strains of different epidemic significance isolated from various sources under conditions of acid and alkaline stress.

Materials and methods. *V. cholerae* strains O1, O139 and nonO1/non O139 serogroups (ctxAB⁺tcpA⁺, ctxAB⁺tcpA⁻) were used in the work. To simulate acid/alkaline stress under *in vitro* conditions, the strains were incubated in a liquid nutrient medium with the addition of hydrochloric, acetic acids and alkali to pH 4.0–11.5. Fatty acid preparations were obtained from the cells and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry on the Maestro 2-7802 device (InterLab, Moscow) using the NIST17 commercial mass spectrum library.

Results. When analyzing the spectra of fatty acids, differences were revealed in the response to short-term acid stress in clinical strains and strains isolated from surface water: clinical strains activated the mechanism of cis/trans isomerization of unsaturated fatty acids, whereas aqueous ones increased phospholipid saturation. At the same time, under conditions of prolonged moderate acid stress, similar reactions were detected in all strains taken into the study: an increase in the unsaturation of membrane lipids and cyclization of acyl chains. Under the influence of alkaline stress in *V. cholerae* strains, regardless of the object of isolation, the appearance of trans isomers of monoene and diene fatty acids, the synthesis of branched, cyclopropane and hydroxyacids was observed. In addition to changes in the fatty acid composition, the synthesis of sugars, amines, alcohols, fatty acid amides, and some secondary metabolites, possibly playing a protective role, was noted under pH stress conditions.

Для корреспонденции:

Шипко Елена Сергеевна, младший научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-9133

Статья поступила 11.08.2025, принята к печати 30.09.2025

For correspondence:

Elena S. Shipko, Junior Researcher, Department of Microbiology of Cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Scientific Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

Address: 117/40 M.Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: (863) 240-9133

The article was received 11.08.2025, accepted for publication 30.09.2025

Conclusion. Specific changes in lipids and cell metabolism in response to changes in the pH of the environment can increase the adaptive/persistent potential of *V. cholerae*, contributing to the preservation of the pathogen in environmental objects and in the human body.

Key words: *Vibrio cholerae*, fatty acids, acid stress, alkaline stress

For citation: Shipko E.S., Duvanova O.V., Pisanov R.V., Kruglikov V.D. The effect of pH stress on the fatty acid spectra of *Vibrio cholerae* strains. Bacteriology. 2025; 10(3): 26–32. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-26-32

Одним из наиболее важных параметров окружающей среды, влияющих на рост и размножение микроорганизмов, является локальная концентрация протонов, которую измеряют как pH.

Микроорганизмы сталкиваются с флуктуациями pH как во внешней среде (в результате естественных геохимических, бактериальных метаболических процессов, антропогенных факторов), так и внутри макроорганизма в течение инфекционного процесса или установления симбиотических связей [1]. Способность выживать при прохождении через кислотный/щелочной барьеры желудочно-кишечного тракта человека является важнейшим этапом жизненного цикла энтеропатогенных бактерий, в т.ч. холерного вибриона, и связано с развитием адаптивной реакции на стресс, известной как реакция толерантности (РТ). Показано, что РТ повышает процент выживших бактериальных клеток в организме хозяина, увеличивая инфекционность возбудителя [2, 3]. РТ зависит от ряда факторов: типа кислоты, концентрации, уровня pH, фазы роста; в ее реализации задействовано более одного молекулярного механизма. Для противодействия критическому изменению pH внутриклеточной среды в условиях кислотного/щелочного стресса бактерии используют несколько стратегий: производство буферных соединений, активацию специальных мембранных насосов, компенсаторные ферментативные сдвиги метаболизма, биопленкообразование [4, 5]. Одним из механизмов устойчивости бактерий к экологическим стрессам является ремоделирование композиционного состава клеточной мембраны. Ключевыми структурными компонентами мембран, первыми реагирующими на изменения параметров окружающей среды, являются жирные кислоты (ЖК), спектры которых, как показано в ряде работ, коррелируют с ацидо/алкилотолерантностью некоторых микроорганизмов [6–8]. Десатурация, элонгация, циклопропанирование, iso/anteiso-разветвления и cis/trans-изомеризация ацильных цепей ЖК модифицируют физические свойства клеточной мембраны, включая температуру фазового перехода, микровязкость, заряд, которые, в свою очередь, модулируют активность мембраносвязанных ферментов, рецепторов, каналов и транспортеров, обеспечивая мощный адаптационный ответ, направленный на защиту внутриклеточной среды. Вызывая изменения в клеточной структуре, метаболизме, транспортных схемах, РТ также может индуцировать перекрестную защиту от других типов стресса, включая стресс, индуцированный антибактериальными препаратами, способствовать переходу в некультивируемое состояние (крайнюю форму адаптации) [9]. Учитывая, что развитие РТ к pH-стрессу повышает степень колонизации биотопов хозяина, интенсивность пролиферации и инвазии, модулирует уровень токсинопродукции, изучение механизмов адаптации к данному виду стресса имеет большое значение.

Цель работы состояла в изучении спектров жирных кислот штаммов *Vibrio cholerae* разной эпидемической значимости, выделенных из различных источников, в условиях кислотного и щелочного стрессов.

Материалы и методы

В экспериментах использовали следующие штаммы *V. cholerae*: токсигенные штаммы, выделенные из клинического материала: O1 classical №13603, O1 El Tor №18332, O139 №16064, и нетоксигенные штаммы, выделенные из воды: O1 El Tor №P-20000, O139 №17682, nonO1/nonO139 №P-20453. Все штаммы были получены из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, где они хранились в ампулах в лиофилизированном состоянии.

Моделирование pH-стресса в условиях *in vitro* проводили согласно схеме, представленной в таблице.

Во всех экспериментах контролями служили культуры штаммов *V. cholerae*, выращенные в 1%-й пептонной воде (pH 7,8) при 37°C.

Жизнеспособность (наличие или отсутствие роста) исследуемых штаммов оценивали бактериологическим методом.

Определение спектров ЖК мембранных липидов проводили методом газовой хромато-масс-спектрометрии на приборе «Мазэстро-2» («Интерлаб», Россия), созданном на базе Agilent при помощи коммерческого ПО «MSD ChemStation» и базы данных химических соединений NIST2017. Дериватизацию ЖК выполняли согласно протоколу, описанному ранее [10]. Концентрации отдельных ЖК выражали в процентах от общей площади пиков и представляли в виде средних арифметических значений (полученных в трех независимых экспериментах).

Индекс насыщенности фосфолипидов определяли по соотношению насыщенных жирных кислот (НЖК) к ненасыщенным жирным кислотам (ННЖК).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета компьютерных программ Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft, США). Для проведения попарных сравнений использовали t-критерий Стьюдента. Доверительный интервал был установлен на уровне 95% ($p \leq 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение

Изучение ростовых характеристик *V. cholerae* при разных значениях pH среды

Для изучения механизмов адаптации возбудителя холеры к pH-стрессу первоначально была изучена динамика роста штаммов *V. cholerae* O1, O139, nonO1/nonO139 в диапазоне pH 4,0–11,5. Выявлено, что у всех штаммов *V. cholerae*, взя-

Таблица. Схема моделирования кислотного/щелочного стрессов
 Table. Acid/alkaline stress modeling scheme

Стресс/ Stress	Питательная среда / Nutrient medium	pH	Корректирующий агент / Corrective agent	Концентрация клеток, кл/мл / Cell concentration, cells/ml	Время инкубации, ч / Incubation time, h
Сублетальный кислотный / Sublethal acid	1%-я пептонная вода / 1% peptone water	4,0	6N HCl	109	0,25–0,5–1–1,5–2
Умеренный кислотный / Moderate acid	1%-я пептонная вода / 1% peptone water	6,0	1N CH ₃ COOH	109	2–24
Умеренный щелочной / Moderate alkaline	1%-я пептонная вода / 1% peptone water	9,0	5N NaOH	109	2–24
Экстремальный щелочной / Extreme alkaline	1%-я пептонная вода / 1% peptone water	11,5	5N NaOH	109	2–24

тых в исследование, диапазон роста составлял pH 6,0–11,5 с оптимумом в области 7,8–9,0. При pH 4,0 рост отсутствовал, а жизнеспособность культуры резко снижалась по мере увеличения времени инкубации с 15 до 60 мин (КОЕ/мл $10^4 \rightarrow 10^1$). При инкубации >60 мин ни один штамм не смог вырасти и сформировать колонии на агаризованной среде. Штаммы *V. cholerae* проявляли разную степень толерантности к уксусной кислоте. Наибольшую устойчивость продемонстрировали штаммы O1 El Tor №P-20000 и nonO1/nonO139 №P-20453: наличие активного роста через 24 ч инкубации при концентрации уксусной кислоты в питательной среде 90 и 50 мМ/л соответственно. Наименьшей устойчивостью обладал штамм O1 classical 13603 – 20 мМ/л. При pH 11,5 все штаммы возбудителя холеры формировали плотную пленку на границе жидкость/воздух (10^8 КОЕ/мл).

Таким образом, были определены следующие условия постановки экспериментов: инкубация при pH 4,0 в течение 60 мин для моделирования сублетального кислотного стресса; инкубация при pH 6,0 в течение 2 и 24 ч для моделирования умеренного кислотного стресса; инкубация при pH 9,0 и 11,5 в течение 2 и 24 ч для моделирования умеренного и экстремального щелочного стрессов.

Влияние кислотного стресса на спектр жирных кислот штаммов *V. cholerae*

Анализ спектров ЖК, выявленных у контрольных образцов (37°C; pH 7,8) штаммов *V. cholerae*, показал преимущественное содержание гексадекановой (C16:0), гексадеценовой (C16:1Δ7) и октадеценовой (C18:1Δ9 и C18:1Δ11) кислот. Суммарное количество этих ЖК варьировало от 62,56 до 80,95%.

После инкубации в условиях сублетального (pH 4,0) и умеренного (pH 6,0) кислотного стресса были выявлены статистически значимые изменения в составе ЖК относительно контролей ($p \leq 0,05$).

Обнаружено, что в ответ на сублетальный кислотный стресс (pH 4,0), индуцированный добавлением в питательную среду соляной кислоты, штаммы возбудителя холеры O1, O139, nonO1/nonO139 серогрупп задействовали несколько типов реакций. Клинические штаммы №№ 13603, 18332, 16064 увеличивали синтез ННЖК (C16:1Δ7; C18:1Δ11) и активировали процесс cis/trans-изомеризации. Геометрическая изомерия является одной из срочных реакций бактериальной клетки на резко изменившиеся условия среды и реализуется в том случае, когда синтез ЖК *de novo* не может быть осуществлен. trans-ННЖК имеют более линейную

структуру по сравнению с cis-изомерами и, подобно НЖК, повышают вязкость мембраны. Количество trans-изомеров (trans-C18:1Δ11) достигало 10–25% от всех детектированных ЖК. Напротив, штаммы, изолированные из объектов окружающей среды, в ответ на сублетальный кислотный шок увеличивали индекс насыщенности мембранных липидов с 1,64–3,5 до 6,96–15,2. Данный процесс был обусловлен увеличением продукции гексадекановой (штамм O139 №17682) и октадекановой кислот (C18:0) (штаммы O1 №P-20000 и nonO1/nonO139 №P-20453) (рис. 1).

Однако высокая сатурация фосфолипидов приводит к избыточной жесткости мембраны и отрицательно сказывается на активности и функциях мембраносвязанных белков. Поэтому на фоне истощения ННЖК в экстремально кислых условиях штаммы холерных вибрионов, изолированные из окружающей среды, вводят в липидный состав разветвлен-

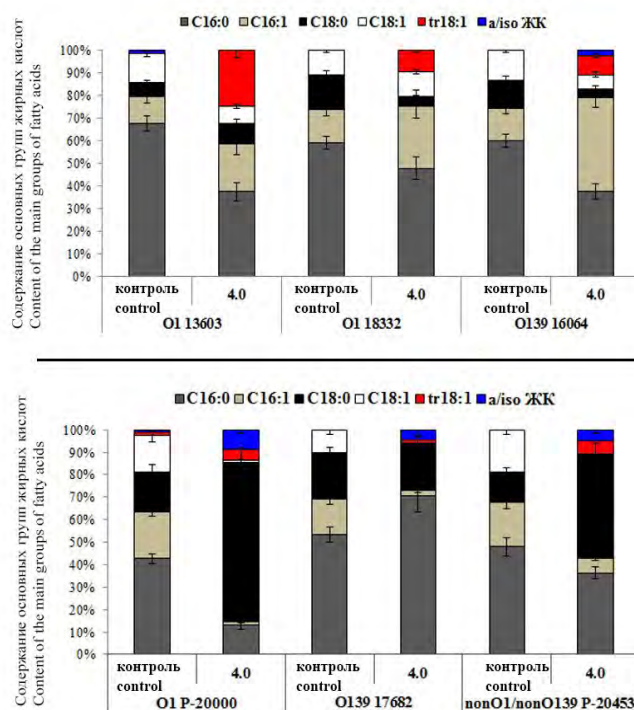


Рис. 1. Спектры ЖК штаммов *V. cholerae* O1, O139, nonO1/nonO139 серогрупп при сублетальном кислотном стрессе соляной кислотой (pH 4,0, 37°C, 60 мин). Вверху – штаммы ctx⁺tcp⁺. Внизу – ctx⁺tcp⁺.

Fig. 1. FA spectra of *V. cholerae* strains O1, O139, nonO1/nonO139 serogroups under sublethal acid stress with hydrochloric acid (pH 4.0, 37°C, 60 minutes). Strains ctx⁺tcp⁺ are at the top. Strains ctx⁺tcp⁺ are at the bottom.

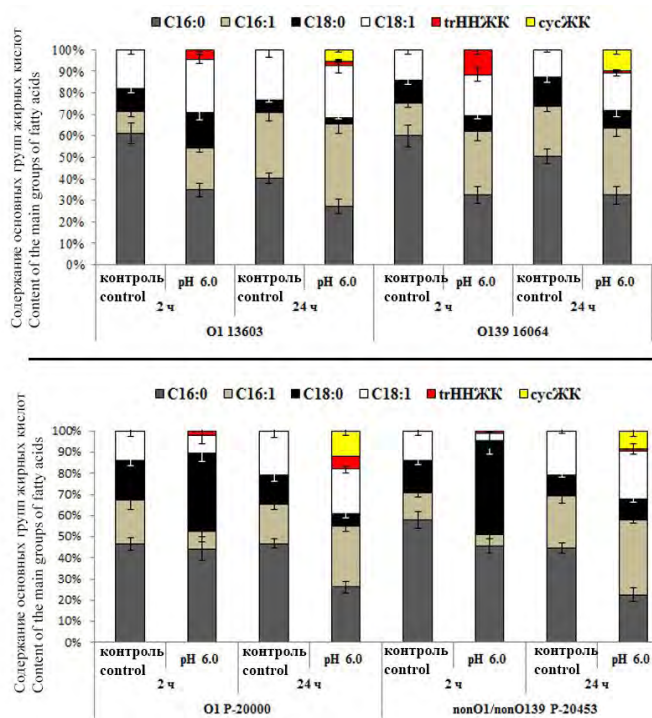


Рис. 2. Спектры жирных кислот штаммов *V. cholerae* при умеренном кислотном стрессе уксусной кислотой (pH 6,0, 37°C, 2–24 ч).

Fig. 2. Fatty acid spectra of *V. cholerae* strains under moderate acid stress with acetic acid (pH 6.0, 37°C, 2–24 hours). Strains *ctx+**tcp+* at the top. Strains *ctx-**tcp-* at the bottom.

ные ЖК и стериноподобные соединения, поддерживающие адекватную текучесть липидного бислоя. Содержание anteiso-разветвленных ЖК (a17:0 и a18:0) в условиях кислотного шока (pH 4,0) составляло 5–20%. Эксперименты на модельных мембранах показали, что мембраны, содержащие фосфолипиды с разветвленными ЖК, оказались более текучие, чем мембраны, содержащие линейные ЖК. ЖК с anteiso-разветвлением более эффективно разжижали мембраны, чем iso-разветвленные. Корреляция между увеличением доли anteiso-ЖК и устойчивостью к pH-стрессу выявлена у ряда других бактериальных патогенов [11].

У штаммов *V. cholerae*, выделенных из воды: O1 El Tor №P-20000, nonO1/nonO139 №P-20453 и O139 №17682, в условиях сублетального кислотного стресса отмечена аккумуляция изопrenoидных соединений: сквалена, геранилгераниола. Сквален – ациклический тритерпен, важный промежуточный продукт для синтеза многих биоактивных терпеноидов, таких как гопаиноиды и стеринны, которые выполняют жизненно важные функции в клетках микроорганизмов, включая антиоксидантную. Данные соединения связаны с образованием функциональных мембранных микродомов, также называемых липидными рафтами. Эти области имеют относительно низкую текучесть мембраны и связаны с белками-флотилинами [12]. Делеция генов, ответственных за синтез гопаиноидов и стериннов, повышает чувствительность бактерий к антибиотикам и детергентам, а также восприимчивость к стрессам, включая изменение pH, температуры и осмотического давления. Ранее у представителей рода *Vibrio* (*V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* и *V. fischeri*) была обнаружена способность синтезировать

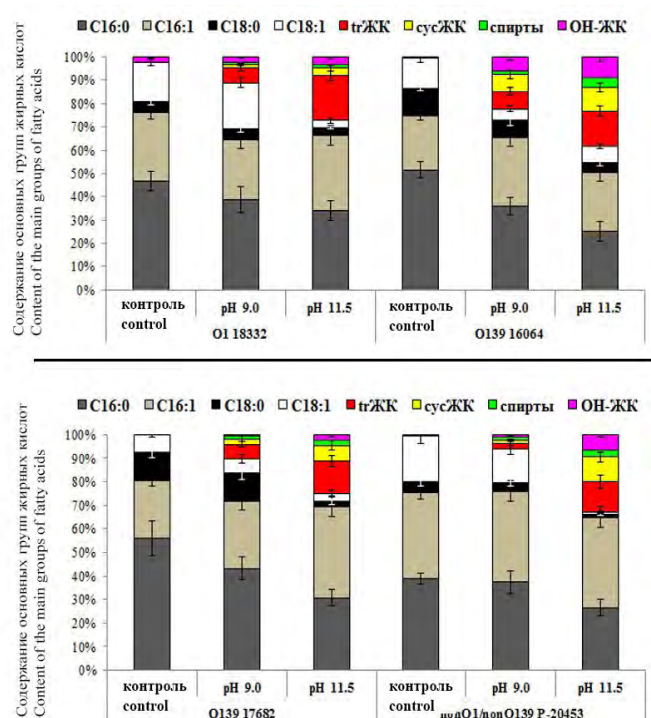


Рис. 3. Спектры ЖК штаммов *V. cholerae* O1, O139, nonO1/nonO139 серогрупп при щелочном стрессе (pH 9,0–11,5, 37°C, 24 ч).

Fig. 3. Fatty acid spectra of *V. cholerae* strains O1, O139, nonO1/nonO139 serogroups under alkaline stress (pH 9.0–11.5, 37°C, 24 h).

изопrenoиды по мевалонатному и по альтернативному 2С-метил-D-эритритол-4-фосфатному пути [13]. Две изопреновые единицы конденсируются с образованием геранилпирофосфата, трех единиц фарнезилпирофосфата, а при конденсации – еще двух единиц геранилгераниолпирофосфата. Затем они циклизуются, гликозилируются и модифицируются с получением различных терпеноидов: моно-, ди-, три-, тетра- и сесквитерпеноидов.

Помимо соляной кислоты, в желудке хозяина бактериальные клетки подвергаются воздействию слабых органических кислот, продуцируемых факультативно-анаэробной и облигатно-анаэробной микрофлорой терминальной части подвздошной и толстой кишок: уксусной, пропионовой, масляной, валериановой и др., механизмы адаптации к которым у бактерий мало изучены. Органические кислоты способны свободно диффундировать через бактериальные мембраны в незаряженном состоянии, а затем диссоциировать внутри клетки с высвобождением протонов во внутриклеточную среду, вызывая подкисление цитоплазмы, нарушение химического градиента и основных метаболических путей [2, 14]. Анионы диссоциированной кислоты, накапливаясь внутри клетки, вызывают тургорный стресс, снижают подвижность клеток и нарушают функцию мембраны. Уксусная кислота является доминирующим экзосимбиотом эндосимбионта человека (60% от всех летучих кислот). Многообразное действие и клинические проявления этого действия позволили отнести молекулы уксусной кислоты и других летучих кислот к классу универсальных химических носителей информации в организме человека [15]. Показано, что экзогенный ацетат влияет на подвижность, образование биопленок, реакции на

стресс и модулирует патофизиологические реакции некоторых энтеропатогенов [16].

Начиная с первых часов воздействия умеренного кислотного стресса (рН 6,0), индуцированного добавлением в питательную среду уксусной кислоты, у большинства штаммов *V. cholerae*, взятых в исследование, отмечено увеличение уровня *cis*-ННЖК (С16:1 и С18:1), за исключением штаммов O1 №P-20000 и nonO1/nonO139 №P-20453, у которых кратковременный стресс вызывал увеличение С16:0 и С18:0, а пролонгированный – их десатурацию (рис. 2).

Ранее на модели *Escherichia coli* зарубежными исследователями продемонстрирована роль двухкомпонентной системы *Cpx* в распознавании кислого рН среды и активации транскрипции генов биосинтеза ННЖК, что приводит к изменению текучести клеточной мембраны и обеспечивает рост *E. coli* в условиях кислотного стресса. Предполагают, что увеличение ненасыщенности фосфолипидов в условиях кислотного стресса не только влияет на текучесть мембраны энтеропатогенов, но и регулирует активность F1F0-АТФазы, которая участвует в поддержании гомеостаза цитозольного рН путем вытеснения протонов из клетки, а также модулирует активность фосфотрансферазной системы (регулирует широкий спектр транспортных процессов, экспрессию многочисленных генов, служит прокариотам для коммуникации и координации, подобно нервной системе животных) [17, 18]. Более того, авторы выдвинули гипотезу, что умеренно кислый рН (например, кишечника хозяина) может также являться активирующим сигналом для системы *Cpx in vivo* и играть важную роль не только в персистенции возбудителя, но и в регуляции факторов вирулентности, включая пили адгезии, секретируемые эффекторы и транспортную систему секреции III типа.

Показана роль данной системы в выведении избытка катионов натрия при щелочном стрессе у некоторых бактерий [19].

Возможно, у возбудителя холеры реализуется аналогичный механизм устойчивости при умеренном кислотном стрессе.

Через 24 ч инкубации в условиях умеренного кислотного стресса часть С16:1 была преобразована в циклопропановые ЖК (сус17:0), количество которых достигало 5–25% от всех ЖК, детектированных в клетке. Молекулярно-динамическое моделирование показало двоякую роль циклопропановых ЖК в физиологии бактериальной клетки: с одной стороны, эти липиды стабилизируют клеточные мембраны в стрессовых условиях, а с другой – регулируют текучесть/проницаемость мембран [20]. У *E. coli* O157:H7 и *Salmonella* Typhimurium циклизация ацильных цепей ЖК в условиях кислотного стресса снижала проницаемость мембраны, препятствуя проникновению протонов в клетку, а также повышала способность экструдировать протоны из цитозоля, помогая бактериям сохранять внутриклеточный гомеостаз рН [21]. Интересно, что для патогенных бактерий также продемонстрирована роль циклопропановых ЖК в реализации вирулентных свойств и устойчивости к противомикробным препаратам [22].

В ответ на сублетальный и умеренный кислотный стресс (рН 4,0 и 6,0) у штаммов *V. cholerae* O1 №№ 13603, P-20000, 18332 и nonO1/nonO139 №P-20453 детектирован синтез

4-аминобутановой кислоты (ГАМК) на 5-й минуте от начала анализа. ГАМК представляет собой четырехуглеродную небелковую аминокислоту, которая обладает широким спектром физиологической активности и синтезируется в клетках растений, грибов, бактерий и эукариотов. ГАМК образуется из глутамата при участии фермента глутаматдекарбоксилазы (ГДК). У микроорганизмов ГАМК функционально участвует в прорастании спор, а также обуславливает устойчивость к экологическим стрессам [23]. Система ГДК обнаружена и у холерного вибриона. Существуют данные, что ГАМК наряду с другими продуцируемыми прокариотами низкомолекулярными веществами (ацетилхолином, серотином, норадреналином, гистамином и другими аминами, летучими ЖК) осуществляют взаимодействие с организмом хозяина. Секретируемые бактериями нейротрансмиттеры могут непосредственно воздействовать на нервные окончания в желудочно-кишечном тракте, а также стимулировать эпителиальные клетки кишечника, которые в ответ высвобождают молекулы, модулирующие нейротрансдукцию по энтеральной нервной системе, оказывая влияние на ось «кишечник–мозг» [24, 25]. У штаммов №№ P-20000, 18332 и P-20453 ГАМК продуцировалась и в условиях щелочного стресса. Помимо ГАМК, у штаммов O1 серогруппы №№ 13603, 18332 и P-20000 при рН 4,0 отмечено накопление фумаровой и азелаиновой кислот, которые известны своими антиоксидантными свойствами.

Влияние щелочного стресса на спектр жирных кислот штаммов *V. cholerae*

Ощелачивание среды также является стрессом для бактерий, о чем свидетельствует активация системы SOS и индукция генов теплового шока в ответ на высокие значения рН среды [26]. Экстремально высокие значения рН среды могут приводить к омылению мембранных липидов и дестабилизации белковых молекул, что, в свою очередь, приводит к растяжению мембраны и ее разрушению.

Повышение рН среды до 9,0–11,5 активировало несколько защитных механизмов в клетках возбудителя холеры: процесс *cis/trans*-изомеризации ННЖК (С16:1, С18:1 и С18:2), синтез разветвленных (а15:0, а17:0) и циклопропановых ЖК (сус17:0, сус19:0). У штаммов №№ P-20000 и 18332 биовара El Tor отмечено увеличение синтеза длинноцепочечных ЖК (С22:1Δ13). Инкубация в условиях щелочного стресса приводила к образованию жирных спиртов: додеканола (через 2 ч инкубации), тетрадеканола (через 24 ч инкубации). У штамма nonO1/nonO139 №P-20453, помимо тетрадеканола, детектировали появление тетрадеценанола, пентадеценанола, пентадекананола. У штаммов O1 серогруппы, помимо жирных спиртов, отмечено увеличение многоатомных спиртов (диолов). Показана роль диолов в обезвреживании гидроксил-радикалов, образующихся в процессе перекисного окисления липидов, который часто сопровождает рН-стресс [27]. У всех штаммов, взятых в исследование, отмечено увеличение гидроксиЖК до 3% при рН 9,0 и до 6% при рН 11,5. Помимо гидроксидодекановой, гидрокситетрадекановой кислот, входящих в состав липополисахарида холерного вибриона, детектирован синтез *iso/anteiso*-гидрокситридекановой кислот, не встречающихся при стандартных условиях культивирования. Через 2 ч инкубации у

всех штаммов при щелочных значениях pH выявлено образование β -гидроксипальмитата. У бактерий β -гидроксипальмитат служит субстратом для синтеза полигидроксипальмитата, а также участвует в антиоксидантной защите в ответ на экологические стрессы. Штаммы холерных вибрионов O139 серогруппы продуцировали гидроксипальмитат и в условиях ацетатного стресса (рис. 3).

Под влиянием щелочного стресса отмечено появление нового класса соединений – амидов ННЖК (олеамид, эрукамид), составляющих до 2–3% от всех детектированных соединений. Амиды ЖК синтезируются в реакциях, катализируемых синтазой жирных кислот II типа, путем амидирования длинноцепочечных НЖК и ННЖК. Известно, что они могут проявлять цитотоксический эффект в отношении посторонней микрофлоры, играть роль в межвидовых взаимоотношениях, осуществлять регуляторную функцию [28].

У штаммов *V. cholerae* №№ 17682 и 16064 O139 серогруппы при pH 9,0 отмечено накопление холестерина, составляющего >30% от всех детектированных в клетке соединений, вероятно, поглощенного и аккумулированного из питательной среды. Патогены человека, включая холерные вибрионы, обладают уникальной способностью ассимилировать и утилизировать экзогенные липиды, в т.ч. липиды хозяина (жирные кислоты и холестерин). Экзогенные липиды являются важными источниками углерода для бактериальных патогенов, которые задействуют их в центральных метаболических путях, способствующих персистенции в организме хозяина и опосредуя патогенез [29].

Помимо ремоделирования ЖК состава липидов под действием щелочного стресса, штаммы возбудителя холеры синтезировали и другие соединения: сахара (α -глюкопиранозид), некоторые вторичные метаболиты, для которых описаны биологически активные свойства (в коммуникации, защите): терпены (гераниол, изоборнеол, борнеол), бензофураны (бензофурануксусная кислота).

Заключение

Получены новые данные о закономерностях изменения ЖК состава липидов *V. cholerae* O1, O139 и nonO1/nonO139 серогрупп разной эпидемической значимости в условиях кислотного/щелочного стрессов. Показано, что краткосрочная инкубация при кислых значениях pH среды вызывала у штаммов *V. cholerae* разные реакции: клинические штаммы реагировали синтезом стерических изомеров ННЖК, тогда как штаммы, выделенные из воды, – синтезом прямых и разветвленных НЖК. Изменения состава ЖК в ответ на длительный умеренный кислотный и щелочной стрессы у штаммов *V. cholerae* независимо от набора детерминант патогенности и источника выделения носили аналогичный характер. Добавление кислоты/щелочи в питательную среду, помимо модификации липидома, стимулировало накопление в клетках специфических веществ, возможно, играющих протективную роль.

Изменения в ЖК-профилях и метаболоме клетки в ответ на изменения pH среды могут увеличивать адаптационный/персистентный потенциал холерного вибриона, способствуя сохранению возбудителя в объектах окружающей среды и в организме хозяина.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Funding information

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Литература / References

1. Cohen ML, Mashanova EV, Jagannathan SV, Soto W. Adaptation to pH stress by *Vibrio fischeri* can affect its symbiosis with the Hawaiian bobtail squid (*Euprymna scolopes*). *Microbiology (Reading)*. 2020 Mar;166(3):262-277. DOI: 10.1099/mic.0.000884
2. Angelichio MJ, Merrell DS, Camilli A. Spatiotemporal analysis of acid adaptation-mediated *Vibrio cholerae* hyperinfectivity. *Infect Immun*. 2004 Apr 1;72(4):2405-07. DOI: 10.1128/IAI.72.4.2405-2407.2004
3. Pradhan A, Ma Q, de Assis LJ, Leaves I, Larcombe DE, Rodriguez Rondon AV, et al. Anticipatory Stress Responses and Immune Evasion in Fungal Pathogens. *Trends Microbiol*. 2021 May;29(5):416-427. DOI: 10.1016/j.tim.2020.09.010
4. Mueller EA, Egan AJ, Breukink E, Vollmer W, Levin PA. Plasticity of *Escherichia coli* cell wall metabolism promotes fitness and antibiotic resistance across environmental conditions. *Elife*. 2019 Apr 9;8:e40754. DOI: 10.7554/eLife.40754
5. Lund PA, De Biase D, Liran O, Scheler O, Mira NP, Cetecioglu Z, et al. Understanding How Microorganisms Respond to Acid pH Is Central to Their Control and Successful Exploitation. *Front Microbiol*. 2020 Sep 24;11:556140. DOI: 10.3389/fmicb.2020.556140
6. Fozo EM, Quivey RJ. Shifts in the Membrane Fatty Acid Profile of *Streptococcus mutans* Enhance Survival in Acidic Environments. *Appl Environ Microbiol*. 2004 Feb;70(2):929-36. DOI: 10.1128/AEM.70.2.929-936.2004
7. Giotis ES, McDowell DA, Blair IS, Wilkinson BJ. Role of branched-chain fatty acids in pH stress tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Feb;73(3):997-1001. DOI: 10.1128/AEM.00865-06
8. Li Z, Jiang B, Zhang X, Yang Y, Hardwidge PR, Ren W, et al. The role of bacterial cell envelope structures in acid stress resistance in *E. coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020 Apr;104(7):2911-2921. DOI: 10.1007/s00253-020-10453-x
9. Mitchell SL, Kearns DB, Carlson EE. Penicillin-binding protein redundancy in *Bacillus subtilis* enables growth alkaline shock. *Appl Environ Microbiol*. 2023 Jan 24;90(1):e0054823. DOI: 10.1128/aem.00548-23
10. Шипко ЕС, Дуванова ОВ. Влияние температурного стресса на спектр жирных кислот штаммов *Vibrio cholerae*. Вестник Пермского университета. Серия Биология. 2022;2:143-54. / Shipko ES, Duvanova OV. Influence of temperature stress on the spectrum of fatty acids of *Vibrio cholerae* strains. *Bulletin of Perm University. Biology*. 2022;2:143-54. DOI: 10.17072/1994-9952-2022-2-143-154 (In Russian).
11. Shohlenkamp C. Membrane Homeostasis in Bacteria upon pH Challenge In: Geiger O (eds). *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, Cham. 2019 Jan 9. DOI: 10.1007/978-3-319-50430-8_57
12. Willdigg JR, Helmann D. Mini Review: Bacterial Membrane Composition and Its Modulation in Response to Stress. *Front Mol Biosci*. 2021 May 11;8:634438. DOI: 10.3389/fmolb.2021.634438
13. Heuston S, Begley M, Gahan CGM, Hill C. Isoprenoid biosynthesis in bacterial pathogens. *Microbiology (Reading)*. 2012 Jun;158(Pt 6):1389-1401. DOI: 10.1099/mic.0.051599-0

14. Bushell FML, Tonner PD, Jabbari S, Schmid AK, Lund PA. Synergistic Impacts of Organic Acids and pH on Growth of *Pseudomonas aeruginosa*: A Comparison of Parametric and Bayesian Non-parametric Methods to Model Growth. *Front Microbiol*. 2019 Jan 8;9:3196. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03196
15. Шендеров БА. Мишени и эффекты короткоцепочечных жирных кислот. Современная медицинская наука. 2013;1-2:21-50. / Shenderov BA. Short-chain fatty acids targets and affects. *Sovremennaya meditsinskaya nauka*. 2013;1-2:21-50. (In Russian).
16. Bernal V, Castaño-Cerezo S, Cánovas M. Acetate metabolism regulation in *Escherichia coli*: carbon overflow, pathogenicity, and beyond. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016 Sep 20;100:8985-9001. DOI: 10.1007/s00253-016-7832-x
17. Sun Y. F1F0-ATPase Functions Under Markedly Acidic Conditions in Bacteria. In: Chakraborti S, Dhalla N (eds). *Regulation of Ca²⁺-ATPases, V-ATPases and F-ATPases. Advances in Biochemistry in Health and Disease*. 2016 Dec;14. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-319-24780-9_22
18. Xu Y, Zhao Z, Tong W, Ding Y, Liu B, Shi Y, et al. An acid-tolerance response system protecting exponentially growing *Escherichia coli*. *Nat Commun*. 2020 Mar 20;11(1):1496. DOI: 10.1038/s41467-020-15350-5
19. Kumar S, Tiwari V, Doerrler WT. Cpx-dependent expression of YqjA requires cations at elevated pH. *FEMS Microbiol Lett*. 2017 Jun 7;364(12). DOI: 10.1093/femsle/fnx115
20. Cronan JE, Luk T. Advances in the Structural Biology, Mechanism, and Physiology of Cyclopropane Fatty Acid Modifications of Bacterial Membranes. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2022 Jun 15;86(2):e0001322. DOI: 10.1128/mmbr.00013-22
21. Karlinsey JE, Fung AM, Johnston N, Goldfine H, Libby SJ, Fang FC. Cyclopropane Fatty Acids Are Important for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Virulence. *Infect Immun*. 2022 Jan 25;90(1):e0047921. DOI: 10.1128/IAI.00479-21
22. Jiang X, Duan Y, Zhou B, Guo Q, Wang H, Hang X, et al. The Cyclopropane Fatty Acid Synthase Mediates Antibiotic Resistance and Gastric Colonization of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*. 2019 Sep 20;201(20):e00374-19. DOI: 10.1128/JB.00374-19
23. Dhakal R, Bajpai VK, Baek KH. Production of GABA (γ -Aminobutyric acid) by microorganisms: A review. *Braz J Microbiol*. 2012 Jun 1;43(4):1230-1241. DOI: 10.1590/S1517-83822012000400001
24. Тлюстангелова РК, Долинный СВ, Пшеничная НЮ. Роль короткоцепочечных жирных кислот в патогенезе острых кишечных инфекций и постинфекционных синдромов. *PMЖ*. 2019;10:31-35. / Tlyustangelova RK, Dolinny SV, Pshenichnaya NYu. The role of short-chain fatty acids in the pathogenesis of acute intestinal infections and post-infectious syndromes. *RMJ (Russian Medical Journal)*. 2019;10:31-35. (In Russian).
25. Олескин АВ, Сорокина ЕВ, Шиловский ГА. Взаимодействие катехоламинов с микроорганизмами, нейронами и с клетками иммунной системы. Успехи современной биологии. 2021;141(1):3-13. / Oleskin AV, Sorokina EV, Shilovsky GA. Interaction of catecholamines with microorganisms, neurons and with the cells of the immune system. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2021;141(1):3-13. DOI: 10.31857/S004213242101021X (In Russian).
26. Saito H, Kobayashi H. Bacterial responses to alkaline stress. *Sci Prog*. 2003 Feb 27;86(4):271-82. DOI: 10.3184/003685003783238635
27. Husain A, Sato D, Jeelani G, Soga T, Nozaki T. Dramatic increase in glycerol biosynthesis upon oxidative stress in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(9):e1831. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001831
28. Dembitsky VM. Microbiological Aspects of Unique, Rare, and Unusual Fatty Acids Derived from Natural Amides and Their Pharmacological Profile. *Microbiol. Res*. 2022 May 26;13(3):377-417. DOI: 10.3390/microbiolres13030030
29. Wilburn K, Fieweger R, VanderVen B. Cholesterol and fatty acids grease the wheels of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Pathogens and Disease*. 2018 Mar 1;76(2):fty021. DOI: 10.1093/femspd/fty021

Информация о соавторах:

Дуванова Ольга Викторовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Писанов Руслан Вячеславович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Кругликов Владимир Дмитриевич, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник, и. о. начальника отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Olga V. Duvanova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, Department of Microbiology of Cholera and other Acute Intestinal Infections, Rostov-on-Don Scientific Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

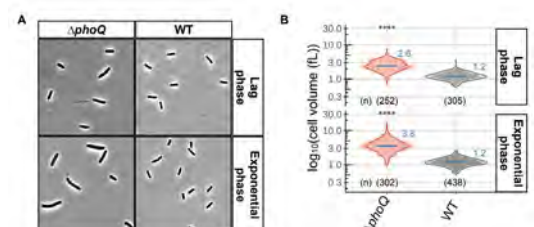
Ruslan V. Pisanov, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Head. Laboratory of Molecular Biology of Natural focal and zoonotic infections, Rostov-on-Don Scientific Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

Vladimir D. Kruglikov, MD, PhD, DSc, Chief Researcher, Acting Head of the Department of Microbiology of Cholera and Other Acute Intestinal Infections, Rostov-on-Don Scientific Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

НОВОСТИ НАУКИ

Небольшие белки *E. coli* открывают новые возможности для понимания бактерий

Бактериальные малые белки регулируют различные клеточные процессы и реакции на стимулы окружающей среды. Авторы идентифицировали малые белки, индуцируемые дефицитом Mg^{2+} в *Escherichia coli*, и исследовали механизмы их индукции, субклеточную локализацию и влияние на рост клеток. Один из них, Yoal, опосредовал взаимодействие между двухкомпонентными сигнальными системами PhoR-PhoB и EnvZ-OmpR, которые контролируют клеточные реакции на дефицит фосфата и осмотический стресс соответственно. Эти результаты расширяют известный репертуар стресс-индуцированных малых белков, регулирующих адаптивную сигнализацию бактерий.



Vellappan S, Sun J, Favate J, Jagadeesan P, Cerda D, Shah P, Yadavalli SS. Analysis of stress-induced small proteins in *Escherichia coli* reveals that Yoal mediates cross-talk between distinct signaling systems. *Sci Signal*. 2025 Aug 26;18(901):eadu7253. DOI: 10.1126/scisignal.adu7253

Опыт проведения полногеномного секвенирования штаммов чумного микроба в полевых условиях за пределами Российской Федерации (Монголия)

Г.Х.Базарова, Е.Е.Бжитских, А.А.Киреев, А.А.Оплеухин, А.Ю.Югушев, Е.Н.Рождественский

ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора, Горно-Алтайск, Российская Федерация

В 2023 г. было проведено испытание мобильной лаборатории для проведения комплексной оценки эпизоотической ситуации на территории Монголии (за пределами Российской Федерации) с проведением генетического анализа выделенных штаммов. Автономность мобильной лаборатории послужила основанием эффективности ее использования при эпизоотологическом обследовании природных очагов чумы, в т.ч. трансграничных, в условиях труднодоступного высокогорья (2300–2800 м над уровнем моря) и отдаленности от лаборатории (560–700 км). Работа мобильной лаборатории (2018, 2019, 2021–2023 гг.) в полевых условиях исключила проблему транспортировки образцов, тем самым повысила сохранность возбудителя от губительного воздействия прямой солнечной радиации и сложного ветрового режима (высушивание). Полученные результаты позволили уточнить и выявить новые эпизоотические участки. Отработанный алгоритм проведения выявления генетических маркеров возбудителя методом полимеразной цепной реакции и дальнейшего выполнения бактериологического анализа положительных проб с целью выделения культуры возбудителя позволил сократить объем и сроки бактериологических исследований. Для проведения комплексного анализа ситуации в 2023 г. выделенные штаммы (20) основного подвида были исследованы методом полногеномного секвенирования, тем самым была продемонстрирована циркуляция генетически отличающихся штаммов чумы основного подвида в пределах одного участка.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, мобильная лаборатория, Сайлюгемский природный очаг чумы, секвенирование, генетическое типирование

Для цитирования: Базарова Г.Х., Бжитских Е.Е., Киреев А.А., Оплеухин А.А., Югушев А.Ю., Рождественский Е.Н. Опыт проведения полногеномного секвенирования штаммов чумного микроба в полевых условиях за пределами Российской Федерации (Монголия). Бактериология. 2025; 10(3): 33–36. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-33-36

Experience of conducting whole genome sequencing of plague microbes strains in field conditions outside the Russian Federation (Mongolia)

G.Kh.Bazarova, E.E.Bzhitskikh, A.A.Kireev, A.A.Opleukhin, A.Yu.Yugushev, E.N.Rozhdestvensky

Altai Anti-Plague Station of Rospotrebnadzor, Gorno-Altaysk, Russian Federation

In 2023, a mobile laboratory underwent testing to conduct a comprehensive assessment of the epizootic situation in Mongolia (outside the Russian Federation) and perform genetic analysis on isolated strains. The laboratory's autonomy facilitated its effective use in epizootological examinations of natural plague foci, including transboundary ones, within challenging highland environments (2,300–2,800 meters above sea level) and at significant distances from established laboratories (560–700 kilometers). Field deployments of the mobile laboratory between 2018 and 2023 eliminated the need for sample transportation, thereby improving pathogen preservation by mitigating the harmful effects of direct solar radiation and complex wind conditions (drying). The obtained results enabled the clarification and identification of new epizootic sites.

The developed algorithm for identifying the pathogen's genetic markers using the PCR method, followed by bacteriological analysis of positive samples to isolate the pathogen culture, significantly reduced both the volume and duration of bacteriological studies. For a comprehensive analysis of the situation in 2023, twenty isolated strains of the main plague subspecies underwent whole-genome sequencing, demonstrating the circulation of genetically distinct plague strains within a single geographical area.

Key words: *Yersinia pestis*, mobile laboratory, Saylyugem natural plague focus, sequencing, genetic typing

For citation: Bazarova G.Kh., Bzhitskikh E.E., Kireev A.A., Opleukhin A.A., Yugushev A.Yu., Rozhdestvensky E.N. Experience of conducting whole genome sequencing of plague microbes strains in field conditions outside the Russian Federation (Mongolia). Bacteriology. 2025; 10(3): 33–36. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-33-36

Для корреспонденции:

Оплеухин Алексей Александрович, кандидат биологических наук, биолог бактериологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Адрес: 649002, Республика Алтай, Горно-Алтайск, ул. Заводская, 2

Статья поступила 16.01.2025, принята к печати 30.09.2025

For correspondence:

Aleksey A. Opleukhin, PhD in Biological Sciences, biologist of the bacteriological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rospotrebnadzor

Address: 2 Zavodskaya str., Gorno-Altaysk, Altai Republic, 649002, Russian Federation

The article was received 16.01.2025, accepted for publication 30.09.2025

В современном мире чума остается одной из социально значимых эпидемических угроз. Способность чумы к быстрому распространению (легочная форма) и сложности организации противоэпидемических мероприятий, с учетом существования активных природных очагов чумы, требуют постоянного мониторинга эпизоотической и эпидемической ситуации. Трансграничный Сайлюгемский природный очаг чумы расположен на российской и монгольской территориях. В Кош-Агачском районе Республики Алтай находится Горно-Алтайский высокогорный природный очаг чумы, уникальностью которого является одновременная циркуляция двух филогенетических линий чумного микроба (с 2012 г.). Высокая эпизоотическая активность Сайлюгемского очага, значимое увеличение его эпидемического потенциала на российской (2014–2016 гг.) и монгольской территориях (2010–2023 гг.) [1] вызвали необходимость создания эффективной системы мониторинга путем реализации международных программ российско-монгольского сотрудничества [2, 3]. Интенсивность эпизоотии на монгольской части трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы выше, чем на российской, тем самым проведение постоянного мониторинга эпизоотологического состояния монгольской части трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы необходимо для снижения риска завоза заболевания и его распространения на сопредельных территориях двух стран.

Применение автономной мобильной лаборатории мониторинга и диагностики (МЛМД) на базе автомобиля «КамАЗ» в непосредственной близости от обследуемых участков с ежедневной доставкой материала обеспечило качественное и оперативное выполнение в полевых условиях лабораторных исследований, что позволило повысить эффективность мониторинга и внести коррективы в тактику эпизоотологического обследования с целью контроля, а также прогноза эпидемиологической и эпизоотологической ситуации по чуме [4].

Цель исследования: оценить эффективность применения автономной МЛМД на базе автомобиля «КамАЗ» для повышения качества и оперативности лабораторных исследований в полевых условиях, а также для улучшения мониторинга и прогнозирования эпидемиологической и эпизоотологической ситуации по чуме.

Материалы и методы

Биологический материал (серый сурок, мелкие млекопитающие, остатки стола хищных птиц, эктопаразиты) отобран и исследован в рамках распоряжения правительства Российской Федерации №973-р от 18.04.2023 и приказа Роспотребнадзора №324 от 30.05.2023 совместного российско-монгольского эпизоотологического обследования монгольской части трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы. Площадь обследования составила 2747,48 км². Использование МЛМД в полевых условиях обеспечило качественное и оперативное проведение лабораторных исследований специалистами ФКУЗ «Алтайская ПЧС» Роспотребнадзора всего полевого материала (100%) методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) («АмплиСенс® *Yersinia pestis*-FL») с последующим бактериологическим анализом с

целью выделения возбудителя и молекулярно-филогенетической оценкой родства изолятов (MinION Mk 1B).

Результаты исследования и их обсуждение

В результате исследований выявлена циркуляция эпидемиологически значимых возбудителей чумного микроба основного подвида (*Yersinia pestis* ssp. *pestis*), что свидетельствует о высокой активности очага. Сохранение его эпидемического потенциала на монгольской территории способствует созданию риска международного распространения на территорию России. Работа мобильной лаборатории в 2018, 2019, 2021–2023 гг. в полевых условиях исключила проблему транспортировки образцов, тем самым повысив сохранность возбудителя от губительного воздействия прямой солнечной радиации и сложного ветрового режима (высушивание) (рис. 1). Полученные результаты позволили уточнить и выявить новые эпизоотические участки. В 2020 г. обследования не состоялись из-за закрытия государственной границы по причине пандемии COVID-19.

Прогноз ситуации по полученным результатам: эпизоотическая активность монгольской части продолжится, так как существует тенденция к расширению эпизоотической территории.

Сопоставляя степень родства изолированных штаммов выявлено, что на одном участке циркулируют генетически отличающиеся штаммы в монгольской части Сайлюгемского природного очага чумы основного подвида (рис. 2).

Для обеспечения задач эпидемиологического благополучия целесообразно применение новых технологий, позволяющих провести комплексную оценку полученных результатов и, таким образом, дающих возможность: предупредить социально-экономические последствия; обеспечить ограничительные меры и поддержание жизненного уровня населения. Испытание мобильной лаборатории с проведением молекулярно-филогенетического анализа выделенных

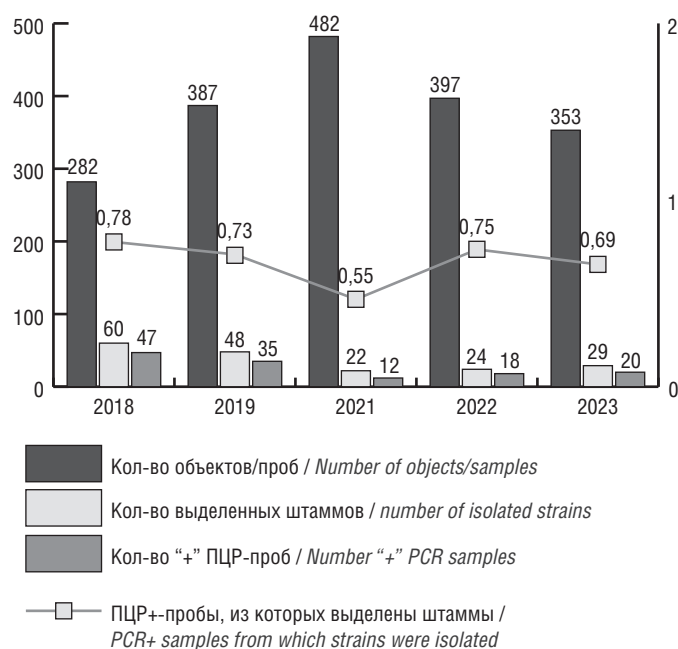


Рис. 1. Объем исследований полевого материала в очаге.
Fig. 1. Volume of studies of field material in the outbreak.

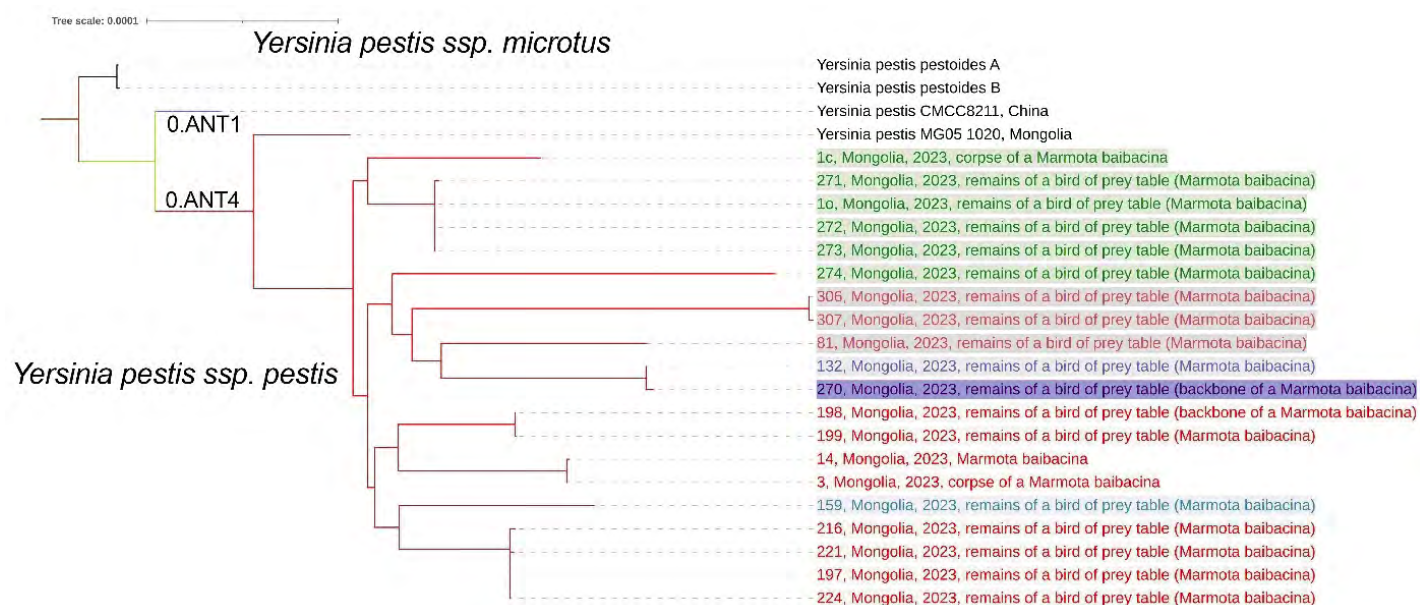


Рис. 2. Дендрограмма филогенетического родства выделенных штаммов [5] (участки эпизоотий представлены цветом) в пределах монгольской части Сайлюгемского природного очага чумы (2023 г.).

Fig. 2. Dendrogram of phylogenetic relationship of isolated strains [5] (epizootic areas are shown in color) within the Mongolian part of the Saylyugem natural plague focus (2023).

штаммов на территории Монголии (за пределами России) позволило провести комплексную оценку эпизоотической ситуации по чуме.

Заключение

Автономность МЛМД послужила основанием эффективности ее использования при эпизоотологическом обследовании природных очагов чумы, в т.ч. трансграничных, в условиях труднодоступного высокогорья (2300–2800 м над уровнем моря) и отдаленности от лаборатории (560–700 км). Отработанный алгоритм проведения выявления генетических маркеров возбудителя методом ПЦР и дальнейшего выполнения бактериологического анализа положительных проб с целью выделения культуры возбудителя позволил сократить количество и сроки бактериологических исследований, тем самым давая возможность обеспечить качественное и оперативное выполнение в полевых условиях лабораторных исследований в полном объеме. Для проведения комплексного анализа ситуации в 2023 г. выделенные штаммы (20) основного подвида были исследованы методом полногеномного секвенирования. Короткие сроки диагностики позволили повысить эффективность мониторинга и внести коррективы в тактику обследуемых участков с целью контроля и прогноза эпидемиологической и эпизоотологической ситуации по чуме.

Проведенное генетическое типирование позволило провести комплексную оценку природного очага чумы с геномной паспортизацией и определением филогенетического родства выделенных штаммов.

Для обеспечения российской биологической безопасности генетическая информация выгружена на национальную платформу VGARus и передана в Референс-Центр ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» для дальнейшего углубленного изучения.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Funding information

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Трансграничный Сайлюгемский природный очаг чумы. Под ред. Балахонова СВ, Корзуна ВМ. Новосибирск, 2022.
2. Обеспечение эпидемиологического благополучия в природных очагах чумы на территории стран СНГ и Монголии в современных условиях. Под ред. Поповой АЮ, Кутырева ВВ. Ижевск: изд-во ООО «Принт», 2018.
3. Балахонов СВ, Корзун ВМ, Денисов АВ, Ярыгина МБ, Рождественский ЕН, Базарова ГХ, и др. Особенности эпизоотического процесса, вызванного возбудителем чумы основного подвида, в трансграничном Сайлюгемском природном очаге чумы. Национальные приоритеты России. 2021;3(42):108–111.
4. Рождественский ЕН, Базарова ГХ, Красавина НЮ, Киреев АА. Особенности использования мобильной лаборатории мониторинга и диагностики при проведении лабораторной диагностики. Проблемы особо опасных инфекций на Северном Кавказе: материалы региональной научно-практической конференции с международным участием, посвященной 70-летию со дня основания ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора. Ставрополь, 17 мая 2022 г. Ставрополь: ООО «Экспо-Медиа», 2022; 127–128.
5. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MT, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. Bioinformatics. 2015 Nov 15;31(22):3691–3. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv421

References

1. Transgranichnyi Sailyugemskii prirodnyi ochag chumy. Pod red. Balakhonova SV, Korzuna VM. Novosibirsk, 2022. (In Russian).
2. Obespechenie epidemiologicheskogo blagopoluchiya v prirodnykh ochagakh chumy na territorii stran SNG i Mongolii v sovremennykh usloviyakh. Pod red. Popovoi AYU, Kutyreva VV. Izhevsk: izd-vo OOO «Print», 2018. (In Russian).
3. Balakhonov SV, Korzun VM, Denisov AV, Yarygina MB, Rozhdestvensky EN, Bazarova GH, et al. The epizootic process caused by plague causative agent of main subspecies' specific traits in transboundary Sailyugem natural focus. Natsional'nye priority Rossii. 2021;3(42):108-111. (In Russian).
4. Rozhdestvenskii EN, Bazarova GK, Krasavina NYu, Kireev AA. Osobennosti ispol'zovaniya mobil'noi laboratorii monitoringa i diagnostiki pri provedenii laboratornoi diagnostiki. Problemy osobo opasnykh infektsii na Severnom Kavkaze: materialy regional'noi nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem, posvyashchennoi 70-letiyu so dnya osnovaniya FKUZ «Stavropol'skii protivochumnyi institut» Rospotrebnadzora. Stavropol', 17 maya 2022 g. Stavropol': OOO «Ekspo-Media», 2022;127-128. (In Russian).
5. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MT, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. Bioinformatics. 2015 Nov 15;31(22):3691-3. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv421

Информация о соавторах:

Базарова Галина Хамроевна, кандидат медицинских наук, заведующая бактериологической лабораторией, врач-бактериолог высшей квалификационной категории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Бжитских Екатерина Евгеньевна, врач-бактериолог бактериологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Киреев Александр Александрович, медицинский лабораторный техник 1-й категории бактериологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Югушев Арчин Юрьевич, врач-бактериолог бактериологической лаборатории ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Рождественский Евгений Николаевич, директор ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Galina Kh. Bazarova, MD, PhD, head of the bacteriological laboratory, bacteriologist of the highest qualification category, Altai Anti-Plague Station of Rospotrebnadzor

Ekaterina E. Bzhitskikh, bacteriologist of the bacteriological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rospotrebnadzor

Aleksandr A. Kireev, medical laboratory technician of the 1st category, bacteriological laboratory of the Altai Anti-Plague Station of Rospotrebnadzor

Archin Yu. Yugushev, bacteriologist of the bacteriological laboratory, Altai Anti-Plague Station of Rospotrebnadzor

Evgeny N. Rozhdestvensky, Director of the Altai Anti-Plague Station of Rospotrebnadzor

НОВОСТИ НАУКИ

Суперустойчивые бактерии обнаружены у диких птиц в реабилитационном центре на побережье штата Сан-Паулу, Бразилия

Распространение *Enterobacterales*, продуцирующих β-лактамазы расширенного спектра (ESBL), когда-то в основном ограничивавшееся учреждениями здравоохранения, стало растущей проблемой, поскольку эти патогены угрожают разнообразным средам, включая места обитания диких животных. В работе описываются клоны *Enterobacterales*, продуцирующие ESBL, высокого риска у диких животных, проходящих реабилитацию в зоологическом парке на юго-востоке Бразилии. Среди 49 отобранных образцов диких млекопитающих и птиц, два штамма *Escherichia coli*, от полосатой неясыти и черного грифа, дали положительный результат на продукцию ESBL и продемонстрировали профили множественной лекарственной устойчивости. Геномная характеристика идентифицировала эти штаммы как принадлежащие к глобально признанным клонам последовательности типа (ST) ST10 и ST155, которые связаны с широко распространенной устойчивостью к противомикробным препаратам (AMR) и тяжелыми инфекциями в медицине и ветеринарии. Штаммы содержали гены резистентности к нескольким противомикробным препаратам и факторы вирулентности, обычно встречающиеся у внекишечных патогенных *E. coli*. Гены, кодирующие ESBL, были связаны с мобильными генетическими элементами: ген *bla*_{CTX-M-15} был встроен в область множественной лекарственной устойчивости, фланкированную элементами Tn3 и IS26, а ген *bla*_{CTX-M-2} — в сложный интегрон класса 1. Данное исследование выявляет потенциальную роль центров реабилитации диких животных как резервуаров критической устойчивости к противомикробным препаратам (УПП), подчеркивая важность мониторинга таких учреждений на наличие приоритетных патогенов. Исследование подтверждает необходимость микробиологического надзора в центрах реабилитации диких животных для предотвращения распространения УПП в естественные экосистемы и призывает к разработке стандартизированных руководств по реинтродукции животных, чтобы гарантировать, что колонизированные дикие животные не будут способствовать распространению резистентных патогенов в дикой природе.



Garcia BBR, Paiva GE, Silva MUB, Furlan JPR, Fuga B, Lemos PR, et al.
High-risk *Escherichia coli* global clones ST10 and ST155 in wild raptors admitted to a rehabilitation center.
Vet Res Commun. 2025 Jul 1;49(4):241. DOI: 10.1007/s11259-025-10811-y

Особенности изменений микробного пейзажа возбудителей гнойно-септических инфекций и их чувствительности к антимикробным препаратам во всех отделениях многопрофильного детского стационара за период 2017–2023 гг.

Ю.Г.Дьячкова

СПб ГБУЗ «Детский городской многопрофильный клинический центр высоких медицинских технологий им. К.А.Раухфуса», Санкт-Петербург, Российская Федерация

В работе изучены изменения микробного пейзажа возбудителей гнойно-септических инфекций в многопрофильном детском стационаре и развитие антибиотикорезистентности у *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* в период с 2017 по 2023 г. Выяснено, что структура высеваемости из года в год оставалась схожей. Основными возбудителями были стафилококки (62,6–69,4%), затем, в порядке убывания, – энтеробактерии (12,1–15,5%), неферментирующие грамотрицательные микроорганизмы (7,1–9,3%), стрептококки (2,6–6%), грибы рода *Candida* (3,8–5%), энтерококки (1,7–2,8%). Доля резистентных штаммов от всех выделенных за год бактерий одного вида изменялась волнообразно по годам в случае *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*. Но у «неферментеров» пики резистентности к антибиотикам разных групп совпадали по годам, а у клебсиеллы пики устойчивости к разным антибиотикам приходились на разные годы. Устойчивость *S. aureus* к антибиотикам в целом выросла, хотя процент резистентных штаммов был меньше, чем у грамотрицательных микроорганизмов. Устойчивость к антибиотикам *S. aureus* менялась также волнообразно по годам, а пики устойчивости к разным антибиотикам приходились на разные годы. Данные наблюдения помогут спрогнозировать и улучшить результаты лечения и эпидемиологическую ситуацию.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, резистентные штаммы, мониторинг микробной флоры, патогены высокого приоритета, микробиота, условно-патогенные бактерии, неферментирующие грамотрицательные бактерии

Для цитирования: Дьячкова Ю.Г. Особенности изменений микробного пейзажа возбудителей гнойно-септических инфекций и их чувствительности к антимикробным препаратам во всех отделениях многопрофильного детского стационара за период 2017–2023 годы. Бактериология. 2025; 10(3): 37–41. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-37-41

Features of changes in the microbial landscape of pathogens causing purulent-septic infections and their sensitivity to antimicrobial drugs in all departments of a children's hospital for the period 2017–2023

Yu.G.Dyachkova

St. Petersburg K.A.Rauhkus Children's Municipal Multi-specialty Clinical Center of High Medical Technology, St. Petersburg, Russian Federation

The work studied changes in the microbial landscape of pathogens causing purulent-septic infections in a multidisciplinary children's hospital and the development of resistance of *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* in the period from 2017 to 2023. It was found that the seeding pattern remained similar from year to year. Staphylococci remained the main pathogens (62.6–69.4% in different years). Then, in descending order,

Для корреспонденции:

Дьячкова Юлия Глебовна, врач-бактериолог СПб ГБУЗ «Детский городской многопрофильный клинический центр высоких медицинских технологий им. К.А.Раухфуса»

Адрес: 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 8
Телефон: (812) 506-06-06

Статья поступила 19.02.2025, принята к печати 30.09.2025

For correspondence:

Yulia G. Dyachkova, bacteriologist, St. Petersburg K.A.Rauhkus Children's Municipal Multi-specialty Clinical Center of High Medical Technology

Address: Ligovsky pr. 8, St. Petersburg, 191036, Russian Federation
Phone: (812) 506-06-06

The article was received 19.02.2025, accepted for publication 30.09.2025

enterobacteria (12.1–15.5%), “non-fermenting” gram-negative microorganisms (7.1–9.3%), streptococci (2.6 to 6%), *Candida* fungi (3.8–5%), enterococci (1.7–2.8%). Antibiotic resistance (percentage of resistant strains from all bacteria of this type isolated per year) of *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* changed in waves over the years. But for “non-fermenters” the peak of resistance to antibiotics of different groups falls on the same year, and for *Klebsiella* the peaks of resistance to different antibiotics fall on different years. The resistance of *S. aureus* to antibiotics has increased in general. The percentage of resistant strains is lower than that of gram-negative microorganisms. The resistance of *S. aureus* to antibiotics also changed in waves over the years, with peaks of resistance to different antibiotics occurring in different years. These observations will help to predict and improve treatment outcomes and the epidemiological situation.

Key words: antibiotic resistance, resistant strains, monitoring changes in microbial flora, high-priority pathogens, microbiota, opportunistic bacteria, non-fermenting gram-negative microorganisms

For citation: Dyachkova Yu.G. Features of changes in the microbial landscape of pathogens causing purulent-septic infections and their sensitivity to antimicrobial drugs in all departments of a children's hospital for the period 2017–2023. Bacteriology. 2025; 10(3): 37–41. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-37-41

В современном мире глобальные изменения экологии сопровождаются ростом бактериальных инфекций. С одной стороны, этиология таких инфекций связана с так называемыми условно-патогенными бактериями, входящими в состав микробиоты человека (стафилококки, стрептококки, энтеробактерии), с другой – в качестве этиологических агентов все чаще выступают неферментирующие грамотрицательные бактерии (НГОВ), не свойственные организму человека, для которых более естественна колонизация влажных объектов внешней среды (*Burkholderia sepacia*, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* и др.) [1].

В нашем многопрофильном клиническом центре среди различных патологий велика доля нозологических форм, этиологическими агентами которых являются бактерии.

Мониторинг изменений микробной флоры, выделяемой в медицинских учреждениях, наряду с выявлением штаммов, предположительно являющихся госпитальными, служат основой для эффективной антибиотикотерапии, рационального использования антисептических, дезинфицирующих средств и своевременного проведения санитарно-эпидемиологических мероприятий [2–5].

В условиях широкого применения антибиотиков бактерии приобретают все более изощренные формы защиты, позволяющие им беспрепятственно выживать и размножаться в присутствии антибиотиков самых последних поколений, становятся антибиотикорезистентными [1, 6–8].

Антибиотикорезистентность – формирование у микроорганизмов особых механизмов защиты, при которых как стандартные, так и повышенные дозы антибактериальных препаратов становятся неэффективными [2].

Применение антибактериальных препаратов приводит к увеличению количества антибиотикорезистентных госпитальных штаммов, затем устойчивые штаммы распространяются среди населения [3].

Всемирная организация здравоохранения в 2024 г. создала список приоритетных патогенных бактерий. В него внесены микроорганизмы, устойчивые к антибиотикам, которые вызывают наибольшие опасения в связи с проблемами передачи, лечения и профилактики. К группе патогенов высокого приоритета относят резистентные *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* [9].

Цель работы: изучение микробного пейзажа возбудителей гнойно-септических инфекций и антибиотикочувствительности наиболее клинически значимых микроорганизмов

во всех отделениях детского многопрофильного стационара с 2017 по 2023 г.

Материалы и методы

Бактериологические исследования проводились в Детском городском многопрофильном клиническом центре высоких медицинских технологий им. К.А.Раухфуса в период 2017–2023 гг. Были исследованы штаммы микроорганизмов, выделенные от пациентов из различных отделений: (челюстно-лицевая хирургия, эндокринология, офтальмология, хирургия, пульмонология, изоляционно-диагностическое отделение, ЛОР-отделение, реанимация и дневной стационар). Биоматериалы для исследования: отделяемое из зева и носа, мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, плевральная, перитонеальная жидкость, гнойное отделяемое, моча, секционный материал, кровь, ликвор, синовиальная жидкость. Материал забирали в тупфер с транспортной средой Эймса без угля (ООО «МК РУСТЕК», Россия). Моча, мокрота, бронхоальвеолярный лаваж поступали в стерильных контейнерах. Посев крови производили на двухфазную систему для аэробных и факультативно-анаэробных гемокультур (ООО «НИЦФ», Россия). Посев биоматериала производили на несколько питательных сред: 5%-й кровяной агар, Эндо, желточно-солевой, шоколадный агар, Сабуро с хлорамфениколом. Также посев производили на среды обогащения – сахарный бульон и тиогликолевую среду. Все среды производства ООО «НИЦФ» (Россия). Желточно-солевой, кровяной и шоколадный агары производились в лаборатории на основе ГМФ-агара (ООО «НИЦФ», Россия) с помощью добавления соли и яичного желтка для желточно-солевого агара и крови или гретой крови в случае кровяного и шоколадного агара соответственно. Посев термостатировали 24 ± 2 ч при температуре 37°C. Выделяли чистую культуру возбудителя, определяли ее количество, идентифицировали до вида и оценивали клиническую значимость. Идентификацию микроорганизмов проводили рутинными бактериологическими методами [10, 11] на основе культуральных, морфологических, тинкториальных, биохимических свойств, а также посредством бактериологического анализатора Walk away 40 plus (Siemens, Германия). Чувствительность к антибиотикам изучали диско-диффузионным методом в соответствии с рекомендациями [12] на агаре Мюллера–Хинтона (ООО «НИЦФ», Россия). Для требовательных культур исследование на антибиотикочувстви-

Таблица 1. Количество выделенных штаммов микроорганизмов по годам
Table 1. Number of isolated microorganism strains by year

Возбудитель/год / Pathogen/year	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023
Стафилококки / <i>Staphylococci</i>	3449 (62,6%)	3627 (66,6%)	3544 (69,4%)	2833 (68,3%)	3355 (64,9%)	3677 (69,0%)	3770 (67,8%)
<i>S. aureus</i>	2827 (51,3%)	3100 (56,9%)	2964 (58,0%)	2184 (52,7%)	2488 (48,1%)	2712 (50,9%)	2892 (52,0%)
Энтеробактерии / <i>Enterobacteria</i>	853 (15,5%)	828 (15,2%)	620 (12,1%)	578 (13,9%)	708 (13,7%)	665 (12,5%)	718 (12,9%)
<i>K. pneumoniae</i>	281 (5,1%)	278 (5,1%)	232 (4,5%)	193 (4,7%)	247 (4,8%)	216 (4,1%)	243 (4,4%)
НГОВ / NFGNB	492 (8,9%)	389 (7,1%)	384 (7,5%)	332 (8,0%)	481 (9,3%)	441 (8,3%)	439 (7,9%)
<i>A. baumannii</i>	67 (1,2%)	59 (1,1%)	45 (0,9%)	51 (1,2%)	42 (0,8%)	66 (1,2%)	62 (1,1%)
<i>P. aeruginosa</i>	141 (2,6%)	154 (2,8%)	118 (2,3%)	151 (3,6%)	164 (3,2%)	125 (2,3%)	133 (2,4%)
Стрептококки / <i>Streptococci</i>	328 (6,0%)	248 (4,6%)	202 (4,0%)	108 (2,6%)	261 (5,0%)	240 (4,5%)	292 (5,2%)
<i>S. pyogenes</i>	29 (0,5%)	11 (0,2%)	15 (0,3%)	22 (0,5%)	15 (0,3%)	35 (0,7%)	128 (2,3%)
<i>S. pneumoniae</i>	269 (4,9%)	198 (3,6%)	168 (3,3%)	76 (1,8%)	177 (3,4%)	138 (2,6%)	135 (2,4%)
Энтерококки / <i>Enterococci</i>	146 (2,7%)	153 (2,8%)	110 (2,2%)	98 (2,4%)	103 (2,0%)	92 (1,7%)	129 (2,3%)
<i>Candida</i> spp.	241 (4,4%)	205 (3,8%)	249 (4,9%)	196 (4,7%)	261 (5,0%)	217 (4,1%)	215 (3,9%)
<i>C. albicans</i>	182 (3,3%)	148 (2,7%)	192 (3,8%)	142 (3,4%)	185 (3,6%)	140 (2,6%)	168 (3,0%)

В таблице представлены данные о структуре высеваемости в процентах от всех выделенных микроорганизмов. /
The table presents data on the structure of seeding as a percentage of all isolated microorganisms.

тельность проводили на среде с добавлением 5% крови и β-НАД.

Статистическую информацию о высеваемости культур и антибиотикочувствительности получали при помощи программы «АльфаЛаб» по ТУ 9443-001-0116899131-2015. Антибиотикорезистентность оценивали по доле/проценту устойчивых к указанному антибиотику штаммов микроорганизма от всех микроорганизмов данного вида, выделенных за год.

Результаты исследования и их обсуждение

Данные о высеваемости возбудителей гнойно-септических инфекций в нашей больнице за указанный период представлены в табл. 1.

Общее количество выделенных микроорганизмов по годам было подвержено некоторым колебаниям, но в течение всего исследуемого периода основными возбудителями оставались стафилококки (62,6–69,4%) и из них на первом месте – *S. aureus*.

Следующими по значимости среди возбудителей являются энтеробактерии. Они высевались в 12,1–15,5%. Среди энтеробактерий важное место занимает *K. pneumoniae*, их доля оставалась стабильной (4,1–5,1%).

НГОВ занимают в структуре высеваемости следующее место – от 7,1 до 9,3% в разные годы (*Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp.).

Доля стрептококков за период наблюдения варьировала по годам от 2,6 до 6%. При этом произошло увеличение высеваемости β-гемолитического стрептококка группы А, доля которого повысилась с 0,2 до 2,3%.

Грибы рода *Candida* были выделены в количестве 3,8–5%, наиболее распространенным из них является *C. albicans* (2,6–3,8% от всех возбудителей гнойно-септических инфекций).

Доля энтерококков оставалась в указанные годы примерно на одном уровне – от 1,7 до 2,8%.

За период с 2017 по 2023 г. мы изучали антибиотикочувствительность наиболее клинически значимых микроорганизмов. Среди НГОВ это *A. baumannii* и *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* среди грамотрицательных микроорганизмов семейства *Enterobacterales*. Из грамположительных микроорганизмов антибиотикорезистентность изучалась у *S. aureus* как у самого частого возбудителя гнойно-септических инфекций.

В ходе исследования выявлено, что резистентность к антибиотикам *A. baumannii* (табл. 2) резко выросла в 2018 г. по сравнению с 2017 г. Рост устойчивости ко всем антибиотикам продолжался до 2020 г., в 2021 г. резистентность снизилась с последующим повышением в 2022 г. по большинству антибиотиков. В 2023 г. снова наблюдается снижение резистентности. В целом можно сказать, что резистентность этого микроорганизма за исследуемые годы выросла.

Устойчивость антибиотиков к *P. aeruginosa* изменялась также волнообразно (табл. 2). Пик резистентности по всем антибиотикам пришелся на 2019 г. В 2020 г. началось снижение антибиотикорезистентности, которое длилось до 2023 г. включительно, лишь устойчивость к имипенему показала высокую цифру в 2021 г., а затем также снижалась.

Если сравнивать динамику антибиотикорезистентности у обоих «неферментеров» – *A. baumannii* и *P. aeruginosa* – и энтеробактерии *K. pneumoniae*, то во всех случаях изменение происходит волнообразно по годам. Но у бактерий группы НГОВ пик резистентности по антибиотикам разных групп приходится на один и тот же год, а у клебсиеллы пики устойчивости по разным антибиотикам приходятся на разные годы.

Устойчивость *S. aureus* к антибиотикам (табл. 2) в целом выросла. Процент резистентных штаммов меньше, чем у грамотрицательных микроорганизмов, которых мы рассматривали ранее. Наибольшая устойчивость у *S. aureus* обнаруживается к эритромицину – до 30% в 2022 г. Резистентность к *S. aureus* менялась также волнообразно по годам, пики устойчивости по разным антибиотикам приходились на разные годы.

Таблица 2. Динамика резистентности бактерий к антибиотикам
Table 2. Dynamics of bacterial resistance to antibiotics

Антибиотик / Antibiotic	Доля резистентных штаммов, % / Proportion of resistant strains, %						
	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023
<i>A. baumannii</i>							
Амикацин / Amikacin	10	54	56	64	36	49	32
Имипенем / Imipenem	9	54	60	62	60	58	27
Левифлоксацин / Levofloxacin	3	7	52	67	33	47	30
Меропенем / Meropenem	9	54	56	61	41	47	25
Триметоприм / сульфаметоксазол / Trimethoprim / sulfamethoxazole	2	3	43	51	21	35	24
Ципрофлоксацин / Ciprofloxacin	8	54	60	67	33	47	30
<i>P. aeruginosa</i>							
Амикацин / Amikacin	16	14	20	11	7	4	0
Имипенем / Imipenem	38	18	41	39	42	19	11
Меропенем / Meropenem	24	21	40	32	28	7	5
Цефепим / Cefepime	25	25	46	38	35	20	10
Цефтазидим / Ceftazidime	23	20	35	34	32	30	12
Ципрофлоксацин / Ciprofloxacin	11	15	31	26	25	11	8
<i>K. pneumoniae</i>							
Амикацин / Amikacin	15	3	12	9	6	7	11
Амоксициллин / Amoxicillin	44	45	53	45	49	47	38
Меропенем / Meropenem	6	3	10	11	3	5	13
Цефотаксим / Cefotaxime	27	25	29	30	30	25	42
Цефтазидим / Ceftazidime	25	21	25	29	24	19	32
Ципрофлоксацин / Ciprofloxacin	14	12	18	17	13	11	18
<i>S. aureus</i>							
Амоксициллин / клавуланат / Amoxicillin / clavulanate	2	6	6	3	3	7	9
Цефокситин / Cefoxitin	2	4	5	4	4	5	6
Гентамицин / Gentamicin	2	5	3	3	3	5	5
Ципрофлоксацин / Ciprofloxacin	4	5	3	5	6	9	6
Эритромицин / Erythromycin	19	28	25	22	23	30	28
Клиндамицин / Clindamycin	5	12	13	1	10	14	10

Заключение

В результате исследования выяснилось, что с некоторыми колебаниями микробный пейзаж за исследуемые годы оставался постоянным. Наибольшее количество выделенных штаммов занимают стафилококки, затем идут энтеробактерии, неферментирующие грамотрицательные микроорганизмы, стрептококки, грибы и энтерококки соответственно.

Изучение антибиотикорезистентности наиболее клинически значимых штаммов выявило волнообразные колебания с пиками для неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов в определенные годы для всех антибиотиков, а для *K. pneumoniae* и *S. aureus* – в разные годы для разных антибиотиков. В целом резистентность грамотрицательных микроорганизмов, включая *K. pneumoniae*, выросла больше, чем у *S. aureus*.

Данный мониторинг позволит спрогнозировать и улучшить результаты лечения и эпидемиологическую ситуацию.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Financial support

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest.

Литература

- Белобородова НВ, Черненькая ТВ, Богданов МБ. Алгоритмы антибиотикотерапии в эпоху антибиотикорезистентности. Изд. 3-е, перераб. и доп. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2019.
- Лазаренко ВА, Кононенко КВ, Бобровская ЕА. Внутрибольничные инфекции и антибиотикорезистентность: актуальные проблемы современной медицины [Электронный ресурс]. Курск: «КГМУ» Минздрава России, 2013. 1 электрон. опт. диск (CD-ROM); 12 см.
- Батищева ГА, Бондаренко ЕВ, Габбасова НВ, и др. Контроль антибиотикорезистентности в медицинской организации: учебное пособие. ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н.Бурденко» Минздрава России, Департамент здравоохранения Воронежской области. Воронеж: Ритм, 2017.

4. Боталов НС, Некрасова ТМ, Боталова НИ, Лукьянцева СА, Карпунина ТИ. Микробиологический мониторинг возбудителей нозокомиальных инфекций из группы ESCAPE в медицинских организациях г. Перми. Бактериология. 2024;9(3):57-61. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-57-61
5. Прушинский АП. Опыт внедрения системы микробиологического мониторинга за возбудителями инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи многопрофильной детской больницы. МедиАль. 2018;2(22):16-20.
6. Лазарева АВ. Микробиологическая характеристика, механизмы устойчивости к антибиотикам и молекулярная эпидемиология резистентных форм респираторных патогенов и госпитальных грамотрицательных бактерий. Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. 03.02.03 – микробиология. ФГАУ НМИЦЗД Минздрава здравоохранения России. М., 2019.
7. Шкиль НН, Нефедова ЕВ. Антибиотикорезистентность микроорганизмов и пути ее преодоления: монография. СФНЦА РАН. Новосибирск: СФНЦА РАН, 2023.
8. Программа SKAT (Стратегия Контроля Антимикробной Терапии) при оказании стационарной медицинской помощи: Российские клинические рекомендации. Под ред. Яковлева СВ, Брико НИ, Сидоренко СВ, Проценко ДН. М.: Издательство «Перо», 2018.
9. World Health Organization. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: Bacterial Pathogens of Public Health Importance to Guide Research, Development and Strategies to Prevent and Control Antimicrobial Resistance. Geneva: World Health Organization; 2024. Available at: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376776/9789240093461-eng.pdf?sequence=1>
10. Ахременко ЯА, Иларова ВИ. Основы клинической микробиологии. Учебное пособие. Основные возбудители нозокомиальных инфекций: вопросы патогенеза, этиотропной терапии и иммунокоррекции. Федеральное агентство по образованию ГОУ ВПО «Якутский государственный университет им. М.К.Аммосова», Медицинский институт ООО «Центр БИО-Диагностика». Якутск, 2010;95.
11. Коротяев АИ, Бабичев АС. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. 4-е изд. СПб.: СпецЛит, 2008;767.
12. Российские рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Версия 2024-02. Год утверждения (частота пересмотра): 2024 (пересмотр ежегодно). МАКМАХ, СГМУ: Смоленск, 2024.
- resource]. Kursk: «KGMU» Minzdrava Rossii, 2013. 1 elektron. opt. disk (CD-ROM); 12 sm. (In Russian).
3. Batishcheva GA, Bondarenko EV, Gabbasova NV, et al. Kontrol' antibiotikorezistentnosti v meditsinskoi organizatsii: uchebnoe posobie. FGBOU VO «Voronezhskii gosudarstvennyi meditsinskii universitet im. N.N.Burdenko» Minzdrava Rossii, Departament zdavookhraneniya Voronezhskoi oblasti. Voronezh: Ritm, 2017. (In Russian).
4. Botalov NS, Nekrasova TM, Botalova NI, Lukyantseva SA, Karpunina TI. Microbiological monitoring of ESCAPE group nosocomial infection agents in medical organizations of Perm. Bacteriology. 2024;9(3):57-61. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-57-61 (In Russian).
5. Prushinsky AP. Experience of implementing a healthcare-associated pathogens microbiological monitoring system in a multi-purpose children's hospital. MediAl'. 2018;2(22):16-20. (In Russian).
6. Lazareva AV. Mikrobiologicheskaya kharakteristika, mekhanizmy ustoichivosti k antibiotikam i molekulyarnaya epidemiologiya rezistentnykh form respiratornykh patogenov i gospital'nykh gramotritsatel'nykh bakterii. Avtoref. diss. ... dokt. med. nauk. 03.02.03 – mikrobiologiya. FGau NMITsZD Minzdrava zdvrkhr. RF. Moscow, 2019. (In Russian).
7. Shkil' NN, Nefedova EV. Antibiotikorezistentnost' mikroorganizmov i puti ee preodoleniya: monografiya. SFNTsA RAN. Novosibirsk: SFNTsA RAN, 2023. (In Russian).
8. Programma SKAT (Strategiya Kontrolya Antimikrobnai Terapii) pri okazanii statsionarnoi meditsinskoi pomoshchi: Rossiiskie klinicheskie rekomendatsii. Pod red. Yakovleva SV, Briko NI, Sidorenko SV, Protsenko DN. M.: Izdatel'stvo «Pero», 2018. (In Russian).
9. World Health Organization. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: Bacterial Pathogens of Public Health Importance to Guide Research, Development and Strategies to Prevent and Control Antimicrobial Resistance. Geneva: World Health Organization; 2024. Available at: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376776/9789240093461-eng.pdf?sequence=1> (In Russian).
10. Akhremenko YaA, Ilarova VI. Osnovy klinicheskoi mikrobiologii. Uchebnoe posobie. Osnovnye vozbuditeli nozokomial'nykh infektsii: voprosy patogeneza, etiotropnoi terapii i immunokorreksii. Federal'noe agentstvo po obrazovaniyu GOU VPO «Yakutskii gosudarstvennyi universitet im. M.K.Ammosova», Meditsinskii institut OOO «Tsentr BIO-Diagnostika». Yakutsk, 2010;95. (In Russian).
11. Korotyayev AI, Babichev AS. Meditsinskaya mikrobiologiya, immunologiya i virusologiya. 4-e izd. SPb.: SpetsLit, 2008;767. (In Russian).
12. Rossiiskie rekomendatsii. Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antimikrobnym preparatam. Versiya 2024-02. God utverzheniya (chastota peresmotra): 2024 (peresmotr ezhegodno). MAKMAKh, SGMU: Smolensk, 2024. (In Russian).

References

1. Beloborodova NV, Chernen'kaya TV, Bogdanov MB. Algoritmy antibiotikoterapii v epokhu antibiotikorezistentnosti. Izd. 3-e, pererab. i dop. M.: OOO «Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo», 2019. (In Russian).
2. Lazarenko VA, Kononenko KV, Bobrovskaya EA. Vnutribol'nichnye infektsii i antibiotikorezistentnost': aktual'nye problemy sovremennoi meditsiny [Electronic

НОВОСТИ НАУКИ

Неизвестные микробы обнаружены в продуктах питания

Используя метод метагеномики, исследователи составили самую большую на сегодняшний день базу данных микробов, связанных с продуктами питания, что позволило идентифицировать разнообразные виды микробов, присутствующих в определенных продуктах питания. База данных, составленная на основе образцов более 2500 продуктов питания из 50 разных стран, включает более 1100 бактериальных геномов. Поскольку некоторые из идентифицированных бактериальных геномов связаны с порчей продуктов питания, исследование обеспечивает основу для контроля качества и тестов на порчу продуктов питания, лучшего понимания некоторых штаммов, обнаруженных в микробиоме человека, и потенциально может применяться в стратегиях сокращения отходов для продления срока годности продуктов питания.

Previously Unidentified Microbes Detected in Food. The Scientist.
<https://www.the-scientist.com/previously-unidentified-microbes-detected-in-food-72215>.

Характеристика литического фага Ph_15, активного в отношении биопленок *Pseudomonas aeruginosa*

Н.В.Колупаева, В.В.Кузин, О.А.Щербакова, Л.В.Колупаева, О.В.Калмантаева,
Н.А.Сухаричева, Н.С.Грищенко, Т.И.Рудницкая, Е.С.Кузина

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

Мультирезистентные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* относятся к числу наиболее важных нозокомиальных патогенов, вызывающих инфекции с высоким уровнем смертности. Благодаря наличию у них большого числа факторов вирулентности эти бактерии вызывают обширное повреждение тканей макроорганизма, а их биопленки ассоциированы с переходом инфекционного процесса в хронический. Для лечения заболеваний, вызванных штаммами, устойчивыми к антимикробным препаратам, а также для борьбы с биопленками *P. aeruginosa* в последние годы разрабатываются альтернативные подходы. Одним из них является использование литических бактериофагов и их ферментов. Применение бактериофагов для борьбы с биопленками, образованными штаммами *P. aeruginosa*, основано на способности некоторых фагов с помощью своих ферментов разрушать внеклеточный матрикс биопленок. В данном исследовании представлена характеристика нового литического бактериофага Ph_15, активного в отношении *P. aeruginosa*. Наличие у фага разрушающей активности в отношении экзополисахаридного матрикса биопленок открывает новые перспективы в борьбе с нарастающей антибиотикорезистентностью.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, разрушение биопленок, бактериофаги, ферменты, экзополисахаридный матрикс, антибактериальная терапия

Для цитирования: Колупаева Н.В., Кузин В.В., Щербакова О.А., Колупаева Л.В., Калмантаева О.В., Сухаричева Н.А., Грищенко Н.С., Рудницкая Т.И., Кузина Е.С. Характеристика литического фага Ph_15, активного в отношении биопленок *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериология. 2025; 10(3): 42–50. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-42-50

Study of phage and disinfectants combination combined for the destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms

N.V.Kolupaeva, V.V.Kuzin, O.A.Shcherbakova, L.V.Kolupaeva, O.V.Kalmantaeva,
N.A.Sukharicheva, N.S.Grishchenko, T.I.Rudnitskaya, E.S.Kuzina

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

Multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* are among the most important nosocomial pathogens causing infections with high mortality rate. Due to the presence of a large number of virulence factors, these bacteria cause extensive tissue damage in the macroorganism, and their biofilms are associated with the transition of the infectious process to chronicity. To treat diseases caused by antimicrobial-resistant strains and to control *P. aeruginosa* biofilms, alternative approaches have been developed in recent years. One of the alternative ways to treat infections caused by *P. aeruginosa* is the use of lytic bacteriophages and their enzymes. The use of bacteriophages to combat biofilms formed by *P. aeruginosa* strains is based on the ability of some phages, with the help of their enzymes, to degrade the extracellular matrix of biofilms. This study presents the characterization of a new lytic bacteriophage Ph_15 active against *P. aeruginosa* biofilms. This study presents the characterization of a new lytic bacteriophage Ph_15 active against *P. aeruginosa*. The presence of phage destructive activity against exopolysaccharide matrix of biofilms opens new perspectives in the fight against growing antibiotic resistance.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm destruction, bacteriophages, enzymes, exopolysaccharide matrix, antibacterial therapy

For citation: Kolupaeva N.V., Kuzin V.V., Shcherbakova O.A., Kolupaeva L.V., Kalmantaeva O.V., Sukharicheva N.A., Grishchenko N.S., Rudnitskaya T.I., Kuzina E.S. Study of phage and disinfectants combination combined for the destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Bacteriology. 2025; 10(3): 42–50. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-42-50

Для корреспонденции:

Колупаева Надежда Вячеславовна, младший научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 31-2182

Статья поступила 11.08.2025, принята к печати 30.09.2025

For correspondence:

Nadezhda V. Kolupaeva, Junior Researcher of Department for training and improvement of specialists, 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) 31-2182

The article was received 11.08.2025, accepted for publication 30.09.2025

Pseudomonas aeruginosa – грамотрицательная условно-патогенная бактерия, вызывающая широкий спектр внутрибольничных заболеваний [1]. Данный патоген отнесен к группе ESKAPE и представляет серьезную угрозу для общественного здравоохранения из-за растущей антибиотикоустойчивости [2]. Карбапенем-резистентная синегнойная палочка занимает 10-е место в списке приоритетных патогенов, опубликованном Всемирной организацией здравоохранения в 2024 г. [3].

Благодаря способности к образованию биологических пленок бактерия колонизирует различные поверхности, в т.ч. медицинские материалы и оборудование пищевой промышленности. Повсеместное распространение *P. aeruginosa* как на биотических, так и на абиотических поверхностях делает данный микроорганизм отличной моделью для изучения бактериальных биопленок [4]. Клетки в форме биопленки приобретают повышенную устойчивость к условиям окружающей среды, антибиотикам и дезинфицирующим средствам, а также к иммунной системе и различным методам облучения [5]. Устойчивость патогена к антибиотикам приводит к неэффективности лечения, и, несмотря на разработку новых антибактериальных препаратов, уровень смертности от инфекций, вызванных *P. aeruginosa*, остается достаточно высоким и составляет 20–60% [6, 7].

Широкое распространение штаммов *P. aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью и их способность образовывать биопленки создают необходимость поиска новых альтернативных средств лечения заболеваний, вызванных данным патогеном, и способов удаления биологических пленок с различных поверхностей.

Альтернативные способы лечения основаны на применении бактериофагов и их ферментов [8, 9]. Применение фагов как самостоятельных противомикробных препаратов не является новым подходом. Однако, несмотря на это, изучение литических фагов и их взаимодействия с бактериальными клетками остается перспективным направлением. Научные исследования демонстрируют высокую эффективность применения бактериофагов, их ферментов и коктейлей в отношении *P. aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью не только в моделях *in vitro* и *in vivo*, но и в клинических исследованиях [10–14]. Это обуславливается способностью бактериофага проникать в биопленку и разрушать ее структуру используя различные механизмы, среди которых: способность разрушать структуру экзополисахаридного матрикса, способность атаковать и убивать бактериальные клетки и способность лизировать клетки после заражения [15]. Некоторые бактериофаги используют литические ферменты, такие как эндолизины и деполимеразы, обладающие ферментативной активностью в отношении бактериальных пленок [13, 16, 17]. Применение фаговых ферментов может существенно улучшить процессы лечения бактериальных инфекций. Однако, несмотря на все преимущества фаговой терапии, ее применение по-прежнему ограничено рядом факторов, одним из которых является недостаточная изученность этих антибактериальных агентов. Поэтому качественная молекулярно-генетическая характеристика бактериофагов может значительно улучшить процесс разработки новых препаратов на их основе.

Цель работы: микробиологическая, молекулярно-генетическая и фенотипическая характеристика фага Ph_15, активного в отношении экзополисахаридного матрикса биопленок *P. aeruginosa*.

Материалы и методы

Выделение и очистка бактериофага

Бактериофаг Ph_15 был выделен ранее из сточных вод Московской области методом обогащения [18]. Для очистки бактериофага фаголизат осаждали в присутствии ПЭГ 8000 (при конечной концентрации 10% и 500 мМ NaCl) в течение 24 ч с последующим центрифугированием при 10 000 g (ротатор Beckman SW50.1 Ti, Beckman Coulter Inc., Бри, Калифорния, США) в течение 10 мин при температуре +4°C. Для дальнейшей характеристики фага использовали бактериальный штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853, полученный из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk», обладающий высокой способностью к образованию биопленок.

Адсорбция фаговых частиц

Для определения кинетики адсорбции клетки *P. aeruginosa* ATCC 27853 выращивали в жидкой питательной среде ГРМ-бульон (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболensk, Россия) до логарифмической фазы, смешивали с бактериофагом Ph_15, при кратности заражения MOI = 0,001 и инкубировали при температуре 37°C. Через определенные промежутки времени (0, 1, 5, 8, 10, 15, 20, 30, 35, 40 мин) отбирали 100 мкл образца, смешивали с 850 мкл SM-буфера и 50 мкл хлороформа. Для удаления бактериальных клеток пробы центрифугировали при 10 000 g в течении 5 мин. Оставшиеся свободные частицы бактериофага титровали методом Грация [19]. Константу скорости адсорбции рассчитывали за 20-минутный период по формуле Адамса [19].

Одиночный цикл развития бактериофага

Клетки *P. aeruginosa* ATCC 27853, выращенные в жидкой питательной среде ГРМ-бульон (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболensk, Россия) до оптической плотности (OD₆₀₀ = 0,5–0,6), осаждали центрифугированием при 7000 g в течение 10 мин при 4°C и ресуспендировали в 1 мл ГРМ-бульона. Затем вносили фаг при кратности заражения MOI = 0,001. После адсорбции смесь центрифугировали при 10 000 g в течение 3 мин для удаления неабсорбированных частиц фага. Осадок растворяли в 20 мл используемой жидкой питательной среды и проводили отбор по 0,1 мл с интервалами в 5 мин на протяжении всего времени культивирования при температуре 37°C (120 мин). Для учета количества свободных вирусных частиц проводили титрование суспензии в полужидком агаре по методу Грация [19].

Устойчивость фага Ph_15 к температуре, pH среды

Температурный спектр устойчивости бактериофага Ph_15 изучали при путем выдерживания фага в диапазоне температур от 8 до 65°C в течение 1 ч. Для оценки стабильности Ph_15 в различных pH суспензию фага (10⁸ БОЕ/мл) инкубировали в растворах pH со значениями от 3 до 12 в течение 1 ч. Влияние температуры и pH среды на стабильность фага

Ph_15 оценивали при помощи определения титра бактериофага стандартным двухслойным методом [19].

Оценка специфичности и спектра литической активности бактериофага

Для определения специфичности фага использовали патогены группы ESKAPE: *Klebsiella pneumoniae* ($n = 17$), *Enterococcus faecium* ($n = 3$), *Staphylococcus aureus* ($n = 3$), *Acinetobacter baumannii* ($n = 3$) и *Enterobacter species* ($n = 3$). Для оценки спектра литического действия использовали клинические штаммы *P. aeruginosa* ($n = 85$). Исследования проводили методом спот-тестирования (Spot-test) [19]. Бактериальные суспензии (10^8 – 10^9 КОЕ/мл) в объеме 0,3 мл смешивали с полужидким агаром (LB-бульон с добавлением 0,6% агарозы) и распределяли по поверхности основного слоя питательного агара. После застывания слоя с полужидким агаром на поверхность наносили по 10 мкл фаголизата с концентрацией фага не менее 10^8 БОЕ/мл и инкубировали при температуре 37°C в течение 18–24 ч. При визуальном осмотре на чашках с чувствительными штаммами *P. aeruginosa* в местах нанесения капли фаголизата наблюдали образование прозрачного пятна лизиса (отсутствие роста бактериальной культуры).

Определение эффективности применения бактериофагов и дезинфицирующих веществ для разрушения биопленок *P. aeruginosa*

Тест-поверхности с биопленкой обрабатывали суспензией бактериофага ($(1,4 \pm 0,5) \cdot 10^9$ БОЕ/мл) в течение 30, 60, 120, 180, 360 мин и 24 ч. После обработки переносили в растворы дезинфицирующих веществ (бензалкония хлорид, N,N-бис(3-аминопропил)-додециламин, полигексаметиленгуанидин гидрохлорид, хлоргексидина биглюконат, перекись водорода, диоксид хлора, дихлоризоцианурат натрия, гипохлорит натрия, нейтральный анолит, глутаровый и ортофталевый альдегиды) на 15 мин. Далее тест-поверхности переносили в раствор нейтрализатора, после чего отмывали трехкратно в SM-буфере, переносили в пробирки с жидкой питательной средой и инкубировали при температуре 37° в течение 48 ч. Критерием эффективности разрушения биопленки считали 100%-ю инактивацию бактериальных клеток в ее составе, о чем судили по отсутствию роста в жидкой питательной среде. В качестве контроля вместо дезинфицирующего вещества использовали стерильную воду.

Электронная микроскопия

Препарат бактериофага с титром (10^9 БОЕ/мл) наносили на медные подложки Formvar для электронно-микроскопических исследований. После высушивания образец окрашивали 0,3%-м водным раствором уранилацетата (pH 4,0). Исследования проводили на электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL, Токио, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Для визуализации соотношения живых/мертвых бактериальных клеток в биопленке использовали метод двойного окрашивания на основе проникаемого для живых клеток SYTO-60 (красный флуоресцентный краситель нуклеиновых кислот) и непроницаемого для мембран живых клеток TOTO-1 (зеленый флуоресцентный краситель, непроницае-

мый для мембран живых клеток, используется для визуализации мертвых клеток и внеклеточной ДНК). Для окрашивания матрикса тест-поверхности с биопленкой помещали в 8 луночный планшет, вносили краситель TOTO-1 (Invitrogen, T3600, США) и оставляли на 15 мин в темноте. Далее отбирали раствор первого красителя и добавляли краситель SYTO-60 (Invitrogen, S11342, США) для окрашивания живых клеток. Через 15 мин образцы отмывали и фиксировали 0,25%-м раствором глутарового альдегида [20]. Визуализацию образцов проводили с помощью конфокального микроскопа OLYMPUS FV3000 (OLYMPUS, Токио, Япония) с масляной иммерсией при увеличении объектива $\times 60$ (объектив UPLXPO60XO 60.0X/1.518 Oil, N/A 1,42, U-DIC60). Для визуализации использовали диодные лазеры с длиной волны излучения 488 и 640 нм для окрашенных TOTO-1 и SYTO-60 образцов соответственно. Мощность лазеров составляла 10% от максимальной. Анализ образцов слепым методом и получение трехмерных изображений проводили с интервалом по оси Z 0,36 мкм. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения cellSens Dimension (Olympus Europa SE & Co. KG, Гамбург, Германия) с использованием плагинов Bio-formats и Comstat2 (Университет Копенгагена, Копенгаген, Дания).

Выделение ДНК бактериофага

Выделение ДНК бактериофага проводили стандартным методом фенол-хлороформной экстракции [21]. Для деградации нуклеиновых кислот штамма-хозяина фаголизаты предварительно обрабатывали растворами нуклеаз (RNase A, DNase and protease-free (10 mg/mL), Thermo Scientific™, США) с последующим добавлением 0,5 M NaCl и ПЭГ 8000 (конечная концентрация 10%). После центрифугирования осадок растворяли в 0,5 мл SM-буфера и инкубировали в присутствии 0,5% SDS, 0,5 M ЭДТА (pH = 8,0) и 50 мкг/мл протеиназы К при 37°C в течении 2 ч (для инактивации фермента образец прогревали 20 мин при 65°C). Далее раствор обрабатывали фенол-хлороформной смесью для разделения фаз. Для очистки нуклеиновых кислот использовали смесь хлороформа и изоамилового спирта с последующей обработкой образца 96%-м охлажденным этиловым спиртом. После центрифугирования и высушивания полученную ДНК растворяли в 50 мкл $\times 1$ TE-буфера и хранили при -20°C.

Секвенирование и аннотация генома фага Ph_15

Для секвенирования генома использовали платформу GenoLab M (GeneMind Biosciences, Гуандун, Китай) с использованием набора Sequencing Reagent V1.0. Для сборки и редактирования полного генома фага использовали программы Newbler 2.9. и SeqMan NGen. Аннотирование геномной последовательности осуществляли с помощью программ GeneMark [22] (<https://exon.gatech.edu/>), RAST (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>) [23] и NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [24].

Построение филогенетических деревьев проводили с использованием PhyML+SMS/OneClick-алгоритма (параметры по умолчанию) web-сервиса NGPhylogeny.fr [25]. Для исследования были взяты аминокислотные последовательности ДНК-полимеразы (GeneBank:XXK85028.1) и основного головного белка капсида (GeneBank:XXK85012.1) бактерио-

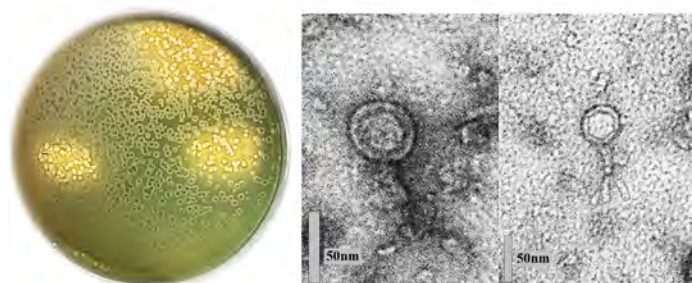


Рис. 1. Негативные колонии бактериофага Ph_15 на газоне штамма-хозяина *P. aeruginosa* ATCC 27853 (слева). Электронная микрофотография фаговых частиц (справа).
 Fig. 1. Negative colonies of bacteriophage Ph_15 on a lawn of the host strain *P. aeruginosa* ATCC 27853 (left). Electron micrograph of phage particles (right).

фага Ph_15. Реконструкцию и редактирование филогенетических деревьев осуществляли с использованием сервиса iTOL [26].

Результаты исследования и их обсуждение

Микробиологическая характеристика бактериофага Ph_15

Бактериофаг Ph_15 был выделен из проб воды Московской области методом обогащения [19]. На бактериальном газоне штамма-хозяина *P. aeruginosa* ATCC 27853 фаг образовывал прозрачные негативные колонии диаметром $5,0 \pm 1,0$ мм с наличием зон неполного лизиса (рис. 1).

По данным электронной микроскопии фаговых частиц выявлено, что бактериофаг Ph_15 имеет головку икосаэдрической формы (40 нм) и хвостовой отросток такой же величины (рис. 1).

Результаты анализа специфичности показали, что бактериофаг Ph_15 является высокоспецифичным в отношении бактерий рода *P. aeruginosa* в отличие от других исследуемых патогенов группы ESKAPE. При этом спектр литической активности штамма бактериофага Ph_15 составил 67,2% и определяется как широкий.

Адсорбция и одиночный цикл развития фага

Для бактериофага Ph_15 были изучены количественные параметры роста посредством оценки скорости адсорбции и определения одиночного цикла развития. Бактериофаг Ph_15 обладал средней скоростью адсорбции. Показано, что >90% частиц фага адсорбировалось на клетках штамма-хозяина в течение 20 мин (рис. 2), при этом константа адсорбции составила $2,2 \cdot 10^9$ мл/мин.

При исследовании одиночного цикла развития было выявлено, что длительность латентного периода (L) бактериофага составляет 30 мин, а выход бактериофага (BS) – $64,4 \pm 2,8$ частицы на зараженную клетку (рис. 3).

Устойчивость фага Ph_15 к температуре и pH среды

К наиболее важным параметрам, влияющим на литическую активность и стабильность бактериофагов при хранении, относятся значение pH среды и устойчивость к температурному воздействию.

Экспериментально показано, что титр бактериофага Ph_15 не менялся в течение 24 ч в случае инкубирования

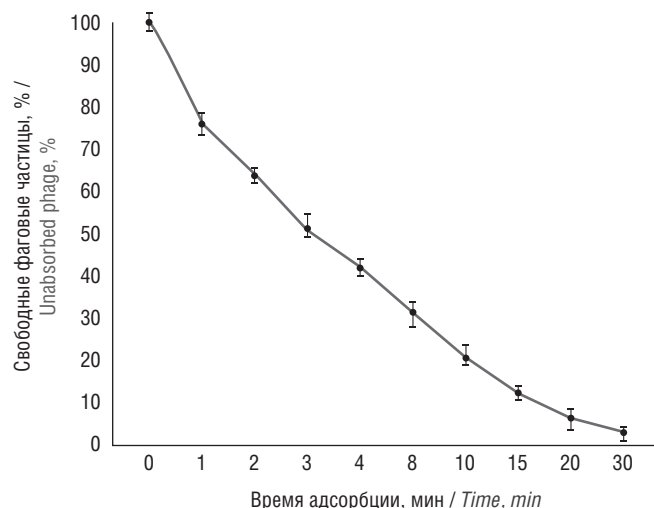


Рис. 2. Динамика адсорбции бактериофага Ph_15.
 Fig. 2. Dynamics of adsorption of bacteriophage Ph_15.

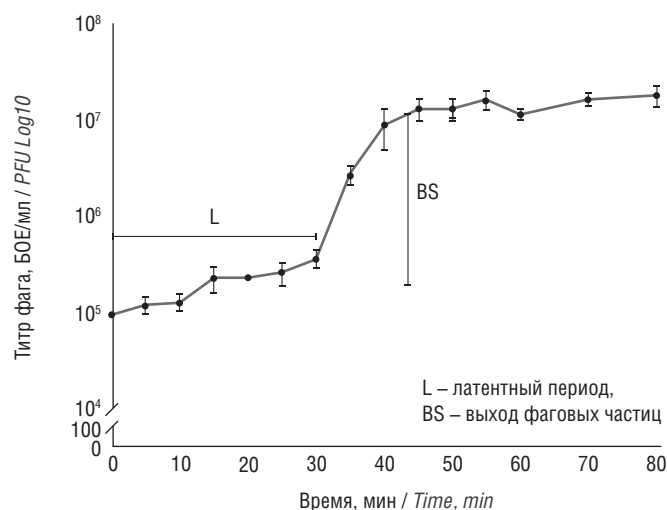


Рис. 3. Кривая одиночного цикла развития бактериофага Ph_15.
 Fig. 3. One-step growth curves of phage Ph_15.

при значениях pH от 4 до 9. В то же время экстремальные значения pH 3 и 12 существенно влияли на стабильность фага и способность инфицировать бактериальные клетки (рис. 4).

При изучении устойчивости фага Ph_15 к воздействию температур установлено, что фаг остается стабильным в диапазоне от +8° до +70°. При этом повышение температуры до +92° вызывает полную инактивацию фага (рис. 5).

Воздействие бактериофага Ph_15 на биопленки *P. aeruginosa*

Несмотря на то, что разрушение биопленок бактериофагами описано во многих работах [15, 27, 28], механизмы данного процесса до конца не изучены. Ранее описано, что разрушение биопленки связано с воздействием экзополисахарид-деградирующих ферментов в составе бактериофагов на полимерную структуру капсулы [28]. Воздействие бактериофага Ph_15 на культуру *P. aeruginosa* предполагает наличие аналогичных ферментов, что подтверждается образованием ореолов вокруг негативных колоний бактериофага.

В экспериментах по оценке активности изучаемого фага в отношении биопленок для их моделирования использова-

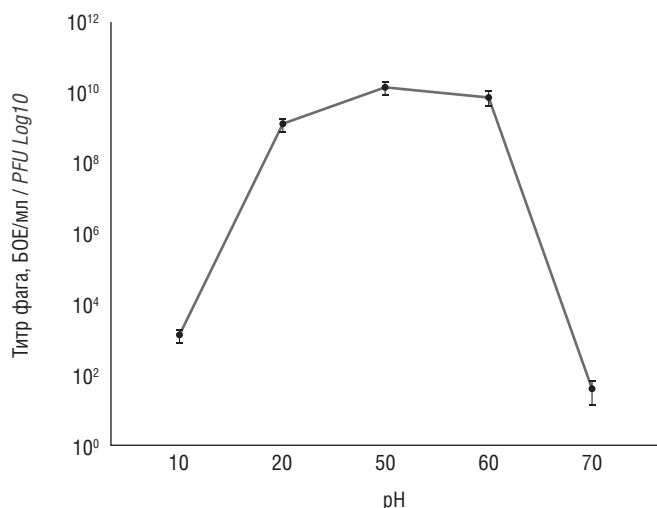


Рис. 4. Влияние pH среды на фаг Ph_15.
 Fig. 4. Effect of pH environment on Ph_15 phage.

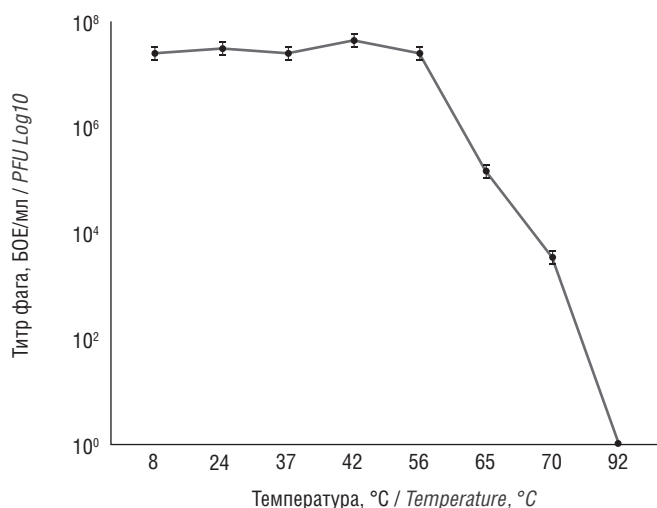


Рис. 5. Влияние температуры на активность фага Ph_15.
 Fig. 5. Effect of temperature on phage Ph_15 activity.

ли штаммы *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *P. aeruginosa* F-19-4pa/19, обладающие самой высокой интенсивностью биопленкообразования и наиболее устойчивые к большинству дезинфицирующих веществ.

Покровные стекла со сформированной биопленкой (48 ч) погружали в суспензию бактериофага на 30, 60, 120, 180, 360 мин и 24 ч, трехкратно отмывали SM-буфером, помещали в пробирки с жидкой питательной средой ГРМ-бульон и инкубировали в термостате при 37°C в течение 48 ч. Критерием эффективности разрушения биопленки считали 100%-ю инактивацию бактериальных клеток в ее составе, о чем судили по отсутствию роста в жидкой питательной среде. Воздействие бактериофага на структуру биопленки оценивали визуально при помощи лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (ЛКСМ).

При ЛКСМ-анализе биопленки выявлена характерная трехмерная структура их организации. Толщина сформированной биопленки колебалась в пределах 30–40 мкм. На изображениях поперечных оптических срезов была хорошо видна периферическая локализация бактериальных агрегатов, расположенных в хаотичном порядке (рис. 6, А, верхний ряд). Схожие данные о формировании биологических пленок описаны в исследовании американских ученых, опубликованном в 2019 г. [29].

При воздействии бактериофага Ph_15 на биопленки в течение 30 мин – 24 ч наблюдали помутнение жидкой питательной среды в пробирках. При воздействии бактериофага Ph_15 в течении 30 мин наблюдали разрушение экзополисахаридного матрикса и снижение толщины биопленок до 10 мкм (рис. 6, Б, нижний ряд). При этом действие фага практически не затрагивало бактериальные клетки, расположенные внутри биопленки. При увеличении времени воздействия до 60 мин отмечали частичный лизис бактериальных клеток, расположенных в верхних слоях биопленки (рис. 6, В, нижний ряд). Дальнейшее увеличение времени воздействия до 24 ч не приводило к полному разрушению биологических пленок, что указывает на остаточное количество жизнеспособных клеток. Несмотря на высокую литическую активность исследуемого фага в отношении планктонных форм *P. aeruginosa*, обработка биопленок фагом не приводила к их разрушению и полному лизису бактериальных клеток.

Согласно данным, опубликованным Chan et al. [30], бактериофаги разрушают экзополисахаридный матрикс биопленки с помощью литических ферментов. На основании этого можно предположить, что способность бактериофага Ph_15 разрушать матрикс биопленки обусловлена наличием подобных ферментов.

Для оценки эффективности комплексного применения фагов и дезинфицирующих веществ покровные стекла с биопленкой погружали в суспензию бактериофага на 30 мин и далее переносили в растворы исследуемых дезинфицирующих веществ на 15 мин. Критерием эффективности комплексной обработки считали 100%-ю инактивацию бактериальных клеток в составе биопленки, о чем судили по отсутствию роста в жидкой питательной среде.

Было показано, что предварительная обработка биопленки бактериофагом Ph_15 позволяет снизить значения показателей минимальных бактерицидных концентраций дезинфицирующих веществ, необходимых для разрушения биологических пленок *P. aeruginosa*, от 2 до 25 раз в зависимости от применяемого вещества. Аналогичные данные, описывающие эффективность комплексного использования фагов и дезинфицирующих средств для улучшения инактивации ассоциированных с поверхностью биопленок *P. aeruginosa*, были получены Stachler et al. [31].

На основании полученных результатов была подтверждена возможность использования бактериофага Ph_15 для разрушения экзополисахаридного матрикса биологических пленок *P. aeruginosa*.

Геномная характеристика фага Ph_15

Согласно результатам секвенирования и сборки, геном бактериофага Ph_15 представлен линейной двухцепочечной ДНК размером 43 260 пар нуклеотидов и GC-составом 45,37%. С помощью биоинформатических программ BLAST и RAST в геноме бактериофага Ph_15 было выявлено 52 открытых рамки считывания (ОРС), кодирующих предполагаемые пептиды от 48 до 1849 азотистых оснований (а.о.), из которых 18 ОРС располагаются на прямой, 34 ОРС – на обратной цепях ДНК. Для 36,5% кодируемых белков опреде-

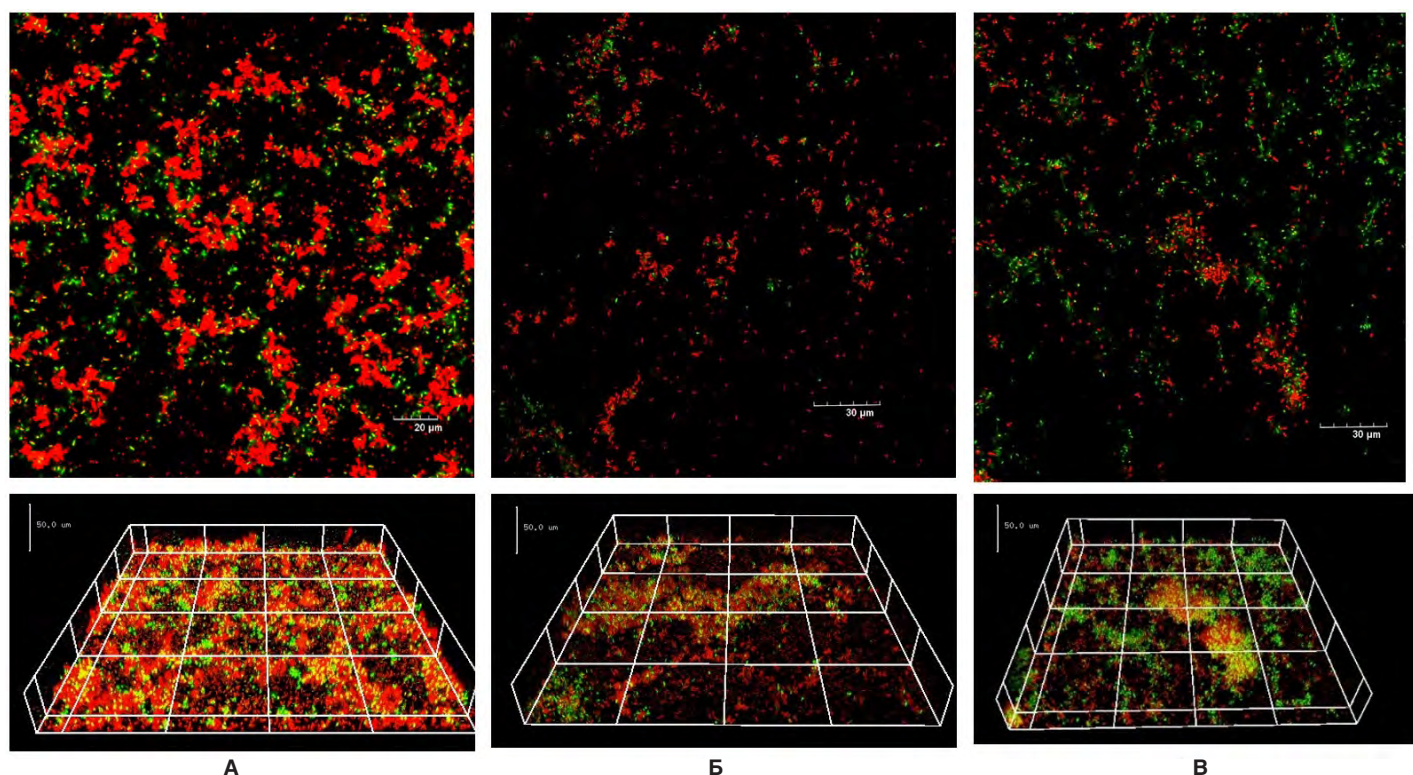


Рис. 6. Воздействие бактериофага Ph_15 на биопленку *P. aeruginosa* F-19-4PA/19: А – сформированная биопленка *P. aeruginosa*; Б – биопленка *P. aeruginosa* после воздействия фага (30 мин); В – биопленка *P. aeruginosa* после воздействия фага (60 мин); верхний ряд – поперечные оптические срезы БП; нижний ряд – 3D-визуализация БП; красным – живые клетки; зеленым – мертвые клетки.

Fig. 6. Effect of bacteriophage Ph_15 on *P. aeruginosa* biofilm F-19-4PA/19: A – formed *P. aeruginosa* biofilm; B – *P. aeruginosa* biofilm after exposure to phage (30 min); C – *P. aeruginosa* biofilm after exposure to phage (60 min); top row – transverse optical sections of biofilm; bottom row – 3D visualization of biofilm; red – living cells; green – dead cells.

лены предполагаемые функции. Оставшуюся часть генома (33 ОРС) составляют гипотетические полипептиды с неизвестной функцией. В число идентифицированных белок-кодирующих последовательностей входят восемь белков, участвующих в структуре и упаковке фага, восемь для репликации ДНК и метаболизма, три для лизиса и один

вспомогательный метаболический ген. Аннотированы геномные последовательности белка, участвующего в упаковке ДНК (большая субъединица терминазы), структурные белки фага (основной белок капсида, внутренние белки вириона и порталных белков). Выявлены гены, кодирующие белки лизиса бактериальных клеток (спанин, трансгликозилаза) и

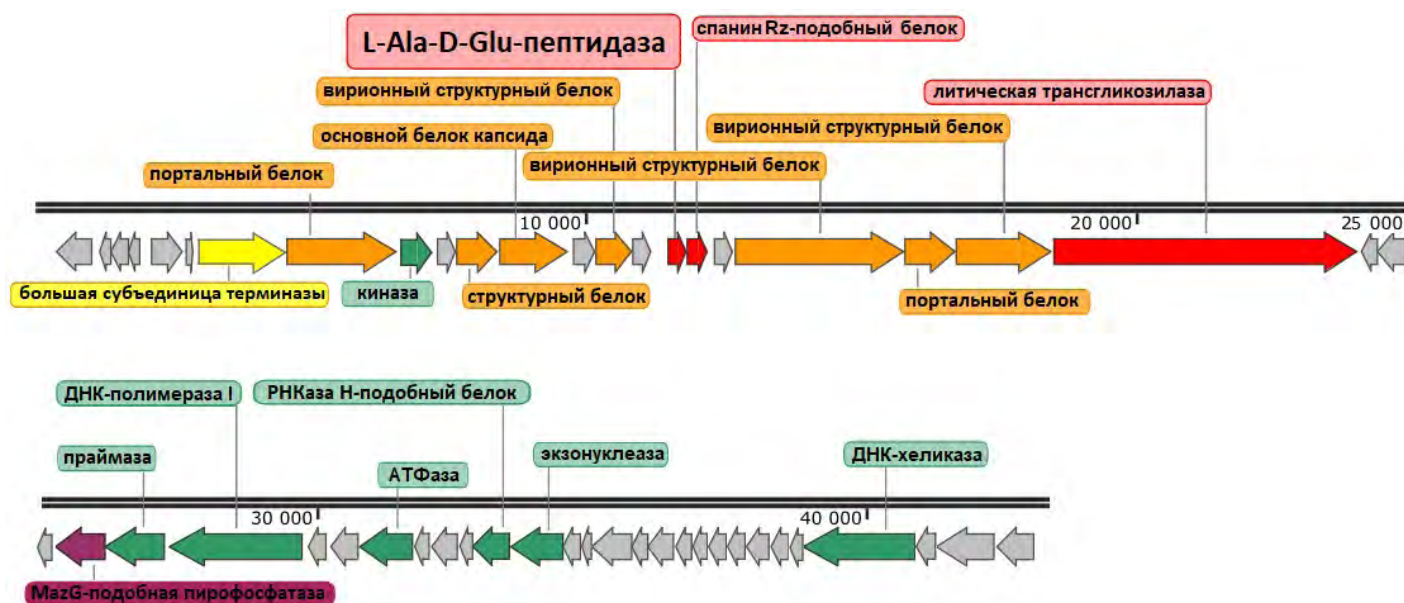


Рис. 7. Генетическая карта бактериофага Ph_15.

Fig. 7. Genetic map of bacteriophage Ph_15.

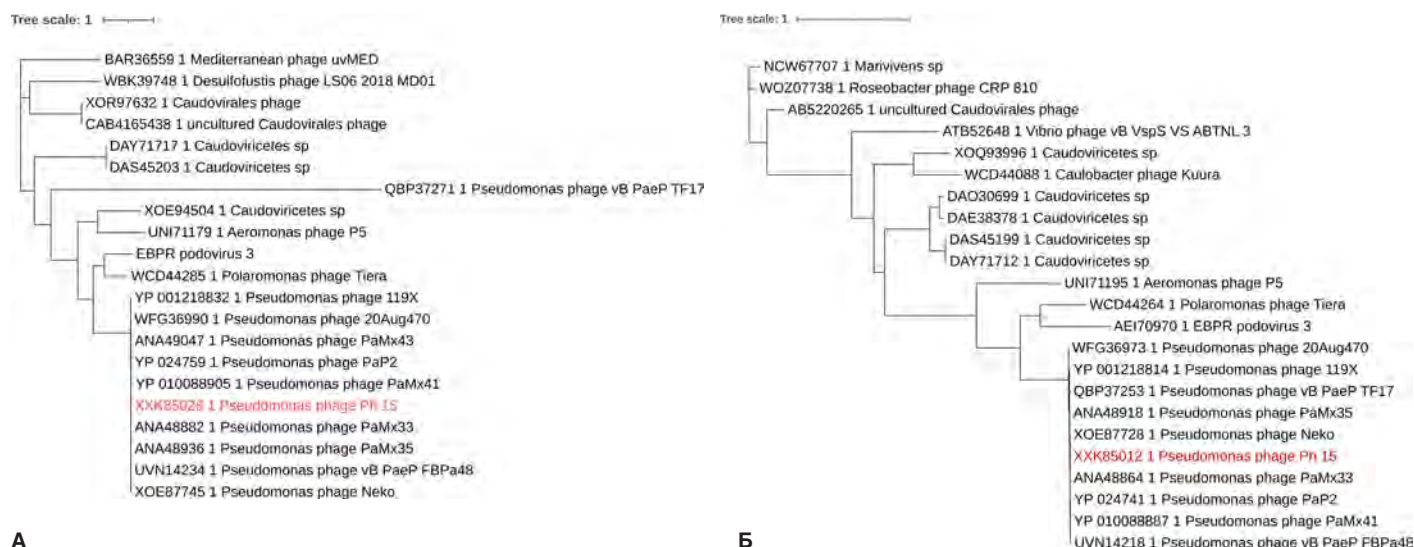


Рис. 8. Филогенетические деревья, построенные на основе выравнивания аминокислотных последовательностей ДНК-полимеразы (А) и основного головного белка капсида (Б).

Fig. 8. Phylogenetic trees constructed based on the alignment of amino acid sequences of DNA polymerase (A) and major head protein (B).

пептидогликанразрушающий фермент (L-Ala-D-Glu-пептидаза). При этом наличие последнего фермента определяет активность фага в отношении экзополисахаридного матрикса биологических пленок *P. aeruginosa*. Установлено, что механизм воздействия бактериофага Ph₁₅ на структуру экзополисахаридного матрикса биологических пленок *P. aeruginosa* основан на взаимодействии L-Ala-D-Glu-пептидазы с полимерной структурой капсулы, что способствует диспергированию полисахаридного матрикса до мономерных структур и разрушению биопленки.

В геноме фага не было обнаружено тРНК, а также генов, ответственных за лизогенный путь развития бактериофага и ассоциированных с устойчивостью к антибактериальным препаратам (рис. 7).

Согласно классификации, принятой Международным комитетом по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses/ICTV), фаг Ph₁₅ принадлежит к отряду хвостатых фагов *Caudoviricetes*. На основании гомологии нуклеотидных последовательностей бактериофаг отнесен к семейству *Fredfastierviridae* (род *Jamesmcgillvirus*). На уровне генома фаг Ph₁₅ продемонстрировал высокую степень сходства с несколькими фагами группы подовирусов. Сравнительный геномный анализ выявил высокую гомологию между ДНК фага Ph₁₅ и литических бактериофагов, выделенных из окружающей среды в Мексике в 2016 и 2023 гг. (GenBank: KU884564.1; KU884565.1; KU884561.1; NC_055711.1) [32], ДНК фага 20Aug470, выделенного в 2023 г. в Израиле (GenBank: OQ319931.1), а также фага PaP2 (GenBank: NC_005884.1), выделенного в 2004 г. в Китае [33]. Идентичность сходства этих фагов составляет 97–98% при величине покрытия 100%. Все перечисленные фаги относятся к семейству *Fredfastierviridae* рода *Jamesmcgillvirus*.

Филогенетический анализ генома бактериофага Ph₁₅

Таксономическая связь Ph₁₅ с фагами рода *Jamesmcgillvirus* подтверждена филогенетическим анализом, основанным на множественных выравниваниях аминокислотных последовательностей ДНК-полимеразы и основного

головного белка капсида представителей разных родов семейства *Fredfastierviridae* (рис. 8).

Гомология последовательностей указывает на возможное наличие общего предка с 119X-подобными фагами и в целом предоставляет информацию о разнообразии подофагов *P. aeruginosa*.

Таким образом, была определена полная нуклеотидная последовательность ДНК бактериофага семейства *Fredfastierviridae* рода *Jamesmcgillvirus*, лизирующего бактерии *P. aeruginosa*. Аннотированная последовательность генома фага Ph₁₅ депонирована в GenBank под номером PV845595.1.

Заключение

В ходе проделанной работы описан новый бактериофаг Ph₁₅, обладающий выраженной литической активностью (67,2%) в отношении *P. aeruginosa*, относящийся к отряду *Caudoviricetes* семейства *Fredfastierviridae* рода *Jamesmcgillvirus*.

Выявлено, что воздействие бактериофага Ph₁₅ на биопленку *P. aeruginosa* приводит к разрушению экзополисахаридного матрикса, что обусловлено наличием у него литических ферментов.

Показано, что геном бактериофага Ph₁₅ представлен линейной двухцепочечной ДНК размером 43 260 пар нуклеотидов. В число идентифицированных белок-кодирующих последовательностей входят восемь белков, участвующих в структуре и упаковке фага, восемь для репликации ДНК и метаболизма, три для лизиса и один вспомогательный метаболический ген. Идентифицированы гены, кодирующие белки лизиса бактериальных клеток (спанин, трансгликозилаза) и пептидогликанразрушающий фермент (L-Ala-D-Glu-пептидаза). Установлено, что механизм воздействия бактериофага Ph₁₅ на структуру экзополисахаридного матрикса биологических пленок *P. aeruginosa* основан на взаимодействии L-Ala-D-Glu-пептидазы с полимерной структурой кап-

сулы, что способствует диспергированию полисахаридного матрикса до мономерных структур и разрушению биопленки. Аннотированная последовательность генома фага Ph_15 депонирована в GenBank под номером PV845595.1.

В данном исследовании показана важная роль фагов в разрушении и инактивации биопленок *P. aeruginosa*. Полученные данные представляют интерес для клинической микробиологии и эпидемиологии, поскольку должны учитываться при оценке эпидемической ситуации, прогнозе ее развития и выборе оптимальных стратегий санитарной обработки.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

1. Salleh MZ, Nik Zuraina NMN, Deris ZZ, Mohamed Z. Current trends in the epidemiology of multidrug-resistant and beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Asia and Africa: a systematic review and meta-analysis. *Peer J*. 2025 Feb 24;13:e18986. DOI: 10.7717/peerj.18986
2. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev*. 2020 May 13;33(3):e00181-19. DOI: 10.1128/CMR.00181-19
3. World Health Organization. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024; WHO Press: Geneva, Switzerland, 2024. Available at: <https://www.who.int/publications/item/9789240093461>
4. Rawat N, Sheoran S, Khan J, Khan R, Alzobaidi N, Alhalmi A. Different aspects of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: an in-depth analysis from formation to detection. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2025 Aug;398(8):9529-9549. DOI: 10.1007/s00210-025-03971-w
5. Tuon FF, Dantas LR, Suss PH, Tasca Ribeiro VS. Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review. *Pathogens*. 2022 Feb 27;11(3):300. DOI: 10.3390/pathogens11030300
6. Ito CAS, Bail L, Arend LNVS, Nogueira KDS, Tuon FF. The activity of ceftazidime/avibactam against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Dis (Lond)*. 2021 May;53(5):386-389. DOI: 10.1080/23744235.2020.1867763
7. Bail L, Ito CAS, Arend LNVS, Nogueira KDS, Tuon FF. Activity of imipenem-relebactam and ceftolozane-tazobactam against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and KPC-producing *Enterobacterales*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2022 Jan;102(1):115568. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2021.115568
8. Al-Wrafy F, Brzozowska E, Górka S, Gamian A. Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* – the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2017 Feb 14;71(0):78-91. DOI: 10.5604/01.3001.0010.3792
9. Vasina DV, Antonova NP, Grigoriev IV, Yakimakha VS, Lendel AM, Nikiforova MA, et al. Discovering the potentials of four phage endolysins to combat gram-negative infections. *Front Microbiol*. 2021;12:748718. DOI: 10.3389/fmicb.2021.748718
10. Shokri D, Soleimani-Delfan A & Fatemi SM. Assessment of phage cocktails with extended host range activity against antibiotic resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Comp Clin Pathol*. 2017;26:417-422. DOI: 10.1007/s00580-016-2394-y
11. Duplessis C, Biswas B, Hanisch B, Perkins M, Henry M, Quinones J, et al. Refractory *Pseudomonas* bacteremia in a 2-year-old sterilized by bacteriophage therapy. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2018 Aug 17;7(3):253-256. DOI: 10.1093/jpids/pix056
12. Chan BK, Turner PE, Kim S, Mojibian HR, Elefteriades JA, Narayan D. Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Evol Med Public Health*. 2018 Mar 8;2018(1):60-66. DOI: 10.1093/emph/eoy005
13. Yuan Y, Qu K, Tan D, Li X, Wang L, Cong C, et al. Isolation and characterization of a bacteriophage and its potential to disrupt multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microb Pathog*. 2019 Mar;128:329-336. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.01.032
14. Doub JB, Ng VY, Johnson AJ, Slomka M, Fackler J, Horne B, et al. Salvage Bacteriophage therapy for a chronic MRSA prosthetic joint infection. *Antibiotics (Basel)*. 2020 May 9;9(5):241. DOI: 10.3390/antibiotics9050241
15. Namonyo S, Weynberg K, Guo J, Carvalho G. The effectiveness and role of phages in the disruption and inactivation of clinical *P. aeruginosa* biofilms. *Environmental Research*. 2023;234:116586. DOI: 10.1016/j.envres.2023.116586
16. Adnan M, Ali Shah MR, Jamal M, Jalil F, Andleeb S, Nawaz MA, et al. Isolation and characterization of bacteriophage to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cells and biofilm. *Biologicals*. 2020 Jan;63:89-96. DOI: 10.1016/j.biologicals.2019.10.003
17. Alqahtani A. Bacteriophage treatment as an alternative therapy for multidrug-resistant bacteria. *Saudi Med J*. 2023 Dec;44(12):1222-1231. DOI: 10.15537/smj.2023.44.12.20230366
18. Колупаева НВ, Щербакова ОА, Колупаева ЛВ, Грищенко НС, Рудницкая ТИ, Кузин ВВ. Комплексное применение бактериофагов и дезинфицирующих веществ для разрушения биопленок *Pseudomonas aeruginosa*. *Бактериология*. 2024;9(4):67-74. / Kolupaeva NV, Shcherbakova OA, Kolupaeva LV, Grishchenko NS, Rudnitskaya TI, Kuzin VV. Study of phage and disinfectants combination combined for the destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Bacteriology*. 2024;9(4):67-74. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-67-74 (In Russian).
19. Adams MH. Bacteriophages; Interscience Publishers: New York, NY, USA, 1959.
20. Diuvenji EV, Nevolina ED, Solovyev ID, Sukhacheva MV, Mart'yanov SV, Novikova AS, et al. A-Type Natriuretic Peptide Alters the Impact of Azithromycin on Planktonic Culture and on (Monospecies and Binary) Biofilms of Skin Bacteria *Kytococcus schroeteri* and *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms*. 2023 Dec 12;11(12):2965. DOI: 10.3390/microorganisms11122965
21. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, NY, USA, 1989.
22. Besemer J, Lomsadze A, Borodovsky M. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. *Nucleic Acids Res*. 2001 Jun 15;29(12):2607-18. DOI: 10.1093/nar/29.12.2607
23. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*. 2008 Feb 8;9:75. DOI: 10.1186/1471-2164-9-75
24. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990 Oct 5;215(3):403-10. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
25. Lemoine F, Correia D, Lefort V, Doppelt-Azeroual O, Mareuil F, Cohen-Boulakia S, et al. NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for non-specialists. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jul 2;47(W1):W260-W265. DOI: 10.1093/nar/gkz303
26. Letunic I, Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Res*. 2024 Jul 5;52(W1):W78-W82. DOI: 10.1093/nar/gkae268
27. Попова АВ, Мякинина ВП, Платонов МЕ, Воложанцев НВ. Молекулярно-генетическая характеристика антибиотикоустойчивых штаммов *Acinetobacter baumannii* и оценка их чувствительности к бактериофагу ар22. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2012;4:18-22. / Popova AV, Myakiniina VP, Platonov ME, Volozhantsev NV. Molecular genetic characterization of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains and assessment of their

- sensitivity to phage ap22. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2012;4:18-22. (In Russian).
28. Sutherland IW, Hughes KA, Skillman LC, Tait K. The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiology Letters*. 2004;232:1-6. DOI: 10.1016/S0378-1097(04)00041-2
29. Reichhardt C, Parsek MR. Confocal laser scanning microscopy for analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture and matrix localization. *Front Microbiol*. 2019;10:677. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00677
30. Chan BK, Abedon ST. Bacteriophages and their enzymes in biofilm control. *Curr Pharm Des*. 2015;21(1):85-99. DOI: 10.2174/138161282066140905112311
31. Stachler E, Kull A, Julian TR. Bacteriophage treatment before chemical disinfection can enhance removal of plastic-surface-associated *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*. 2021 Aug 4;87(20):e0098021. DOI: 10.1128/AEM.00980-21
32. Cruz-Plancarte I, Cazares A, Guarneros G. Genomic and transcriptional mapping of PaMx41, archetype of a new lineage of bacteriophages infecting *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*. 2016 Oct 27;82(22):6541-6547. DOI: 10.1128/AEM.01415-16
33. Kwan T, Liu J, Dubow M, Gros P, Pelletier J. Comparative genomic analysis of 18 *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. *J Bacteriol*. 2006 Feb;188(3):1184-7. DOI: 10.1128/JB.188.3.1184-1187.2006

Информация о соавторах:

Кузин Виктор Владимирович, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Щербак Ольга Анатольевна, младший научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Колупаева Любовь Вячеславовна, младший научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Калмантаева Ольга Валерьевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Сухаричева Наталья Алексеевна, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Грищенко Наталья Семёновна, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Рудницкая Татьяна Ивановна, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Кузина Екатерина Сергеевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Viktor V. Kuzin, Researcher of the Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Olga A. Shcherbakova, Junior Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Lyubov V. Kolupaeva, Junior Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Olga V. Kalmantaeva, PhD in Biological Sciences, Researcher of Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Natalia A. Sukharicheva, Junior Researcher of Culture Collection Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Natalya S. Grishchenko, Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Tatyana I. Rudnitskaya, Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Ekaterina S. Kuzina, PhD in Biological Sciences, Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

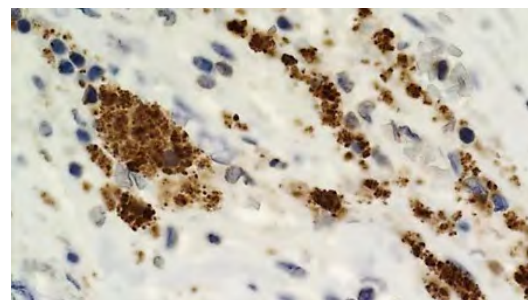
НОВОСТИ НАУКИ

Бактерии биопленки могут способствовать возникновению сердечных приступов

Спустя почти четыре десятилетия авторы сообщили, что затвердевшие холестериновые бляшки в артериях могут содержать бактерии полости рта, заключенные в биопленку, что делает их невосприимчивыми к антибиотикам и иммунной системе организма. Не сами бактерии, а реакция организма хозяина начинает разрушать структуры, приводящие к инфаркту миокарда. Эти результаты открывают возможности для разработки новых методов диагностики и предотвращения инфарктов, ориентированных на биопленку. Это еще одно доказательство, которое говорит о потенциальной инфекционной причине риска сердечно-сосудистых заболеваний.

Чтобы глубже понять влияние бактерий на атеромы изучили артериальные бляшки, полученные от 121 жертвы внезапной смерти и 96 хирургических пациентов.

Количественные эксперименты ПЦР показали, что 65 процентов образцов бляшек внезапной смерти и 58 процентов хирургических бляшек имели ДНК оральных зеленящих стрептококков, в основном *Streptococcus mitis*. Чтобы определить присутствие реальных бактерий, а не только их ДНК, исследователи окрасили образцы антителами против трех наиболее распространенных зеленящих стрептококков и заметили, что более половины образцов внезапной смерти и хирургических операций показали присутствие бактерий в ядре бляшек. Когда они совместно окрасили бляшки биомаркером макрофагов, они заметили, что иммунные клетки не обнаружили бактериальные скопления внутри атером, что указывает на то, что бактерии были заключены в биопленку.



Поэтапное выделение внеклеточной и геномной ДНК на примере микобактерий

А.В.Ильинов^{1,2}, А.Г.Савицкая³, О.Е.Хохлова⁴, Ю.С.Винник¹, О.В.Теплякова¹

¹ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Российская Федерация;

²Частное учреждение здравоохранения «Клиническая больница «РЖД-Медицина» г. Красноярск», Красноярск, Российская Федерация;

³ФГБУН «Государственный научный центр Российской Федерации «Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» РАН, Москва, Российская Федерация;

⁴ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболensk, Московская область, Российская Федерация

Цель исследования. Разработать протокол раздельного выделения внеклеточной и геномной ДНК оптимальной концентрации и чистоты на примере микобактерий.

Материалы и методы. В работе были использованы штаммы микобактерий *Mycobacterium intracellulare* и *Mycobacterium avium*. Выделение ДНК проводили из культур бактерий в начале экспоненциальной фазы роста. Выделение внеклеточной ДНК с поверхности бактериальных клеток проводили путем инкубации в ТЕ-буфере с последующим мягким центрифугированием. Надосадочную жидкость использовали для получения внеклеточной ДНК, из осадка клеток получали геномную ДНК. Для апробации метода использовали краситель RMAxx™, инкубировали клетки бактерий с RMAxx™ перед выделением ДНК. Полученные образцы использовали как матрицу для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

Результаты. Получены образцы внеклеточной и геномной ДНК из *M. intracellulare* и *M. avium* с концентрацией и чистотой, оптимальными для проведения ПЦР-РВ. Получены образцы геномной ДНК *M. intracellulare* (41 нг/мкл) и *M. avium* (39,2 нг/мкл). Внеклеточная ДНК *M. intracellulare* получена в концентрации 9,23 нг/мкл, *M. avium* – 6,1 нг/мкл. Обработка красителем RMAxx™, ковалентно связывающимся с молекулами ДНК, препятствовала амплификации участков. После окраски RMAxx™ проведено количественное определение 16S рРНК и SigA с помощью ПЦР-РВ. Инкубация с RMAxx™ привела к снижению геномной ДНК максимум в 1,8 раза. В образцах внеклеточной ДНК инкубация с RMAxx™ вызвала снижение количества 16S рРНК и SigA в 5 раз.

Заключение. Данный метод применим для получения образцов внеклеточной и геномной ДНК бактерий в необходимых количестве и чистоте для проведения последующего анализа

Ключевые слова: микобактерии, геномная ДНК, полимеразная цепная реакция, внеклеточная ДНК, пропидиум моноазид

Для цитирования: Ильинов А.В., Савицкая А.Г., Хохлова О.Е., Винник Ю.С., Теплякова О.В. Поэтапное выделение внеклеточной и геномной ДНК на примере микобактерий. Бактериология. 2025; 10(3): 51–55. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-51-55

Step-by-step isolation of extracellular genomic DNA of mycobacteria

A.V.Ilinov^{1,2}, A.G.Savitskaya³, O.E.Khokhlova⁴, Yu.S.Vinnik¹, O.V.Teplyakova¹

¹Prof. V.F.Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation;

²Private Healthcare Institution “Clinical Hospital” of Russian Railways Medicine Krasnoyarsk, Krasnoyarsk, Russian Federation;

³M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov State Research Center of the Russian Federation Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation;

⁴State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor, Obolensk, Moscow region, Russian Federation

Для корреспонденции:

Ильинов Александр Владимирович, врач-хирург Клинической больницы «РЖД-Медицина» г. Красноярск, старший преподаватель кафедры общей хирургии им. проф. М.И.Гульмана Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого

Адрес: 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1
ORCID: 0000-0002-8247-1388

Статья поступила 30.04.2025, принята к печати 30.09.2025

For correspondence:

Aleksandr V. Ilinov, surgeon, Clinical Hospital “RZhD-Medicine” in Krasnoyarsk, senior lecturer of the Professor M.I.Gulman Department of General Surgery, Prof. V.F.Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University

Address: 1 Partizan Zheleznyak str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation
ORCID: 0000-0002-8247-1388

The article was received 30.04.2025, accepted for publication 30.09.2025

Aim. To develop a protocol for the extraction of extracellular DNA (eDNA) and genomic DNA (gDNA) from mycobacteria, addressing erroneous concentration and purity issues.

Materials and methods. The mycobacterial strains *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium avium* were used in this study. DNA extraction was performed during the early exponential growth phase. Extracellular DNA (eDNA) was isolated from the bacterial cell surface by incubation in TE buffer, followed by gentle centrifugation. The supernatant was used to obtain eDNA, while gDNA was obtained from the cell pellet. PMAxx™ dye was utilized to differentiate between live and dead cells; bacterial cells were incubated with PMAxx™ prior to DNA extraction. The obtained samples were then used as a template for real-time PCR (RT-PCR).

Results. We successfully obtained eDNA and gDNA samples from *M. intracellulare* and *M. avium* with concentrations and purities suitable for RT-PCR. gDNA samples exhibited concentrations of 41 ng/μl for *M. intracellulare* and 39.2 ng/μl for *M. avium*. cfDNA quantities were 9.23 ng/μl for *M. intracellulare* and 6.1 ng/μl for *M. avium*. Following treatment with PMAxx™ dye, which covalently binds to DNA and prevents amplification, we quantitatively determined the levels of 16S rRNA and SigA using real-time PCR. Incubation with PMAxx™ resulted in a maximum 1.8-fold decrease in gDNA. In eDNA samples, PMAxx™ incubation caused a 5-fold decrease in the amounts of both 16S rRNA and SigA.

Conclusions. This method is applicable for extracting bacterial eDNA and gDNA with the required quantity and purity for subsequent analysis.

Key words: mycobacterium, genome DNA, polymerase chain reaction, extracellular DNA, propidium monoazide

For citation: Ilinov A.V., Savitskaya A.G., Khokhlova O.E., Vinnik Yu.S., Teplyakova O.V. Step-by-step isolation of extracellular genomic DNA of mycobacteria. Bacteriology. 2025; 10(3): 51–55. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-51-55

Внеклеточная ДНК (вкДНК) бактерий играет важную роль в жизнедеятельности бактериальных популяций, в частности способствует формированию биопленок, лекарственной устойчивости, участвует в горизонтальном переносе генов [1]. Несмотря на то, что геномная (гДНК) и вкДНК происходят из одной и той же клетки, они могут отличаться друг от друга в зависимости от механизма высвобождения вкДНК. Так, оказавшись вне бактериальной клетки, вкДНК может подвергнуться фрагментации, что, в свою очередь, способно изменить ее [2, 3].

У микобактерий также обнаружена вкДНК, которая является неотъемлемым компонентом биопленки. В 2015 г. Rose et al. была опубликована работа, где проводилось сравнение соотношения жизнеспособных клеток (КОЕ) в биопленке, образованной *Mycobacterium avium*, с количеством вкДНК в различные временные промежутки. Было обнаружено, что в популяции *M. avium* происходит значительное увеличение вкДНК между 1-м и 7-м днями инкубации, но при этом различия в КОЕ между этими временными точками незначительны, что предполагает наличие механизмов высвобождения ДНК, отличных от лизиса бактериальных клеток [4, 5]. Однако вопрос, какие именно это механизмы, до сих пор остается открытым [5, 6]. В качестве наиболее вероятного механизма нелитического высвобождения вкДНК у микобактерий было предложено наличие pH-зависимого экспорта вкДНК с помощью FtsK/SpoIIIE-подобного белка, ответственного за транслокацию ДНК за пределы клеточной стенки [7]. Литический механизм высвобождения вкДНК у микобактерий осуществляется профагами, активация которых приводит к высвобождению ДНК. На основании геномных сиквентов определены последовательности профагов phiRv1 и phiRv2 у *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv [8], а также профаги phiMAV_1 и phiMAV_2 у *Mycobacterium avium* 104. PhiMU01 и PhiMU02 обнаружены в геноме *Mycobacterium clearans* Ag99 [9]. У *Mycobacterium marinum* описаны 10 профагов (phiMmar 01–10), среди которых есть и полноразмерные (phiMmar 02 и 08). У штаммов *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium massiliense*, *Mycobacterium smegmatis* и *Mycobacterium simiae* также обнаружены профаги [10, 11].

Обнаружение в геноме микобактерий профагов говорит о возможности реализации выхода ДНК в результате актива-

ции профага с последующим лизисом бактериальной клетки. Сравнение сиквентов вкДНК и гДНК может дать дополнительную информацию о реальных способах высвобождения вкДНК. Однако методологически достаточно трудно получить отдельные фракции вкДНК и гДНК. Жизненный цикл бактерий включает в себя формирование биопленок, матрикс которых состоит из разных компонентов, взаимодействующих друг с другом. Например, нуклеиновые кислоты могут быть связаны с белками или ионами – компонентами матрикса, что усложняет экстракцию вкДНК из матрикса; таким образом, для высвобождения вкДНК необходимо разрушить различные связи ДНК с внеклеточными белками, полисахаридами и другими полимерами. Сравнение методов экстракции вкДНК из матрикса биопленок, сформированных *Acinetobacter* sp., показало, что использование ферментов (N-гликаназа (гидролаза деградации гликопротеина), дисперсин В (гликозидгидролаза, диспергирующая биопленку) и протеиназы К (гидролаза белка) от 60 до 190 раз эффективнее [12]. В случае отдельного выделения вкДНК и гДНК необходимо избежать массового лизиса клеток для исключения попадания гДНК в образец вкДНК.

Цель исследования. В данной статье мы описываем протокол отдельного выделения вкДНК и гДНК на примере микобактерий, позволяющий выделить их в оптимальной концентрации и чистоте.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы *M. tuberculosis* var. BCG Tokyo 172, *Mycobacterium intracellulare* 13950 и *M. avium* subsp. *hominissuis* 104 были инкубированы до OD₆₀₀ = 1,5 в бульонной среде 7H9/ADC. Бактериальную массу получали путем центрифугирования на Eppendorf Centrifuge 5417R, ротор FA-45-24-11, при 3500 об./мин, при комнатной температуре в течение 20 мин. Осадок суспендировали в 200 мкл ТЕ буфера (1 М Трис-HCl, pH 8,0 и 0,5 М ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), pH 8,0) в ПЦР-пробирке и замораживали при -80°C в течение 1 ч. Затем образец размораживали и добавляли к нему 100 мкл свежеприготовленной смеси хлороформа и метанола (2:1), центрифугировали при 8200 об./мин при комнатной температуре в течение 10 мин,

надосадочную жидкость удаляли, а осадок высушивали при 50°C в течение примерно 1 ч. Высушенный осадок ресуспендировали в 200 мкл буфера TE с 20 мкл 1 М буфера TE-HCl, pH 9,0 и добавлением лизоцима до конечной концентрации 100 мкг/мл. Образец инкубировали при 37°C в течение ночи. По завершении инкубации в образцы добавляли протеиназу К (Invitrogen) до конечной концентрации 200 мкг/мл в присутствии 10% SDS и инкубировали при 50°C не менее 3 ч.

Для удаления белков из смеси нуклеиновых кислот добавляли 3 М раствора ацетата натрия (pH 5,2) и раствор А в объемном отношении 1:1:1. Для получения раствора А смешивали фенол / хлороформ / изоамиловый спирт в объемном соотношении 25:24:1. Перемешивали с осторожностью, путем покачивания пробирки в течение нескольких минут. Далее все образцы центрифугировали в течение 10 мин, 8200 об./мин при комнатной температуре. Супернатант, содержащий гДНК, переносили в стерильную пробирку типа эппендорф и осаждали добавлением неразбавленного охлажденного изопропанола. Образец центрифугировали в течение 10 мин, 8200 об./мин при комнатной температуре, после этого супернатант удаляли, а осадок промывали в 400 мкл 70%-го этилового спирта. Образец центрифугировали еще раз в течение 10 мин, 8200 об./мин при комнатной температуре. Осадок ресуспендировали в 200 мкл буфера TE и вносили RNase A (ribonuclease A) до конечной концентрации 1 мг/мл (Macherey-Nagel, Германия), после чего образцы инкубировали при 37°C в течение 30 мин. После добавляли 3 М ацетата натрия (pH 5,2) и раствор А в объемном отношении 1:1:1, далее образцы были центрифугированы в течение 10 мин при 8200 об./мин при комнатной температуре. Супернатант, содержащий ДНК, переносили в чистый эппендорф и отмывали охлажденным изопропанолом и 70%-м этиловым спиртом. Полученный осадок ДНК высушивали на воздухе в течение примерно 10 мин. Растворение осадка проводили путем добавления TE-буфера с последующей инкубацией в течение ночи при 50°C. Далее образец хранился при температуре -20°C.

Выделение вкДНК проводилось с использованием протокола, описанного выше, но без этапа разрушения бактериальной мембраны (без обработки клеток лизоцимом). Полученный осадок вкДНК, растворенный в буфере TE, хранился при температуре -20°C.

Качественный и количественный анализ образцов проводился с помощью автоматизированного электрофореза Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies, США).

Апробация метода выделения вкДНК проводилась на бактериальных штаммах *M. intracellulare* и *M. avium*, которые выращивали до оптической плотности $OD_{600} = 1,0$ на бульонной среде 7H9/ADC при температуре 37°C. Для сравнения эффективности метода выделения вкДНК и гДНК бактериальную суспензию разделяли на аликвоты по 400 мкл, добавляли РМАхх™ до конечной концентрации 25 мкМ и инкубировали в темноте в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем образцы подвергали воздействию светового излучающего диода (PMA-Lite™ LED Photolysis Device 50–60 Гц, 100–240 В переменного тока, выходная мощность светодиода 60 Вт, длина волны 465–475 нм) в течение 15 мин для перекрестного связывания РМАхх™ с ДНК.

После бактериальные клетки промывали и осаждали центрифугированием при 3500 об./мин в течение 10 мин. гДНК и вкДНК экстрагированы раствором А, как описано выше. Полученные образцы ДНК использовали в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) (CFX96 Touch Deep Well™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, Калифорния, США), направленной на амплификацию 16S рРНК и SigA. Негативным контролем являлись бактериальные клетки, убитые нагреванием при температуре 95°C в течение 5 мин.

Результаты исследования и их обсуждение

Показано влияние вкДНК на формирование бактериальных биопленок, увеличение их стабильности и устойчивости при воздействии стресса, в т.ч. при воздействии антимикробных препаратов. Механизмы высвобождения вкДНК могут быть различны, сравнение сиквенсов бактериальной вкДНК и гДНК может помочь в выявлении механизмов высвобождения вкДНК бактерий [3, 4–6]. Однако выделение молекул вкДНК, находящихся на поверхности бактерий, осложняется тем, что молекулы ДНК связаны с внеклеточными белками, полисахаридами и другими полимерами на поверхности бактериальной клетки или с компонентами биопленки. Кроме того, при манипуляциях выделения может быть высвобождена гДНК из-за разрушения бактериальных клеток в процессе выделения вкДНК. Мы адаптировали

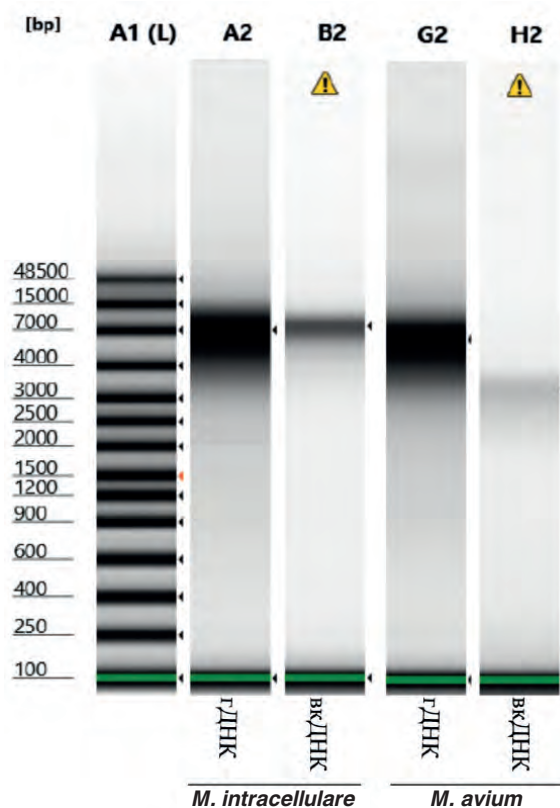


Рис. 1. Электрофореграмма ДНК клеток *M. intracellulare* и *M. avium*: A1 – маркер, A2 – гДНК *M. intracellulare*, B2 – вкДНК *M. intracellulare*, G2 – гДНК *M. avium*, H2 – вкДНК *M. avium*.

Fig. 1. Electrophoresis of DNA from *M. intracellulare* and *M. avium* cells: A1 – marker, A2 – гДНК (genomic DNA) of *M. intracellulare*, B2 – вкДНК (cell-free DNA) of *M. intracellulare*, G2 – гДНК of *M. avium*, H2 – вкДНК of *M. avium*.

метод выделения ДНК из образцов тканей человека для раздельной экстракции вкДНК микобактерий [14].

Выделение гДНК и вкДНК проводили из клеток *M. intracellulare* и *M. avium*. Перед экстракцией гДНК с поверхности бактериальных клеток была удалена вкДНК путем обработки клеток ТЕ-буфером с ЭДТА [13]. Экстракцию липидов клеточной стенки проводили по методу Фолча [14]. Лизис бактериальных клеток проводили лизоцимом в течение ночи. Инактивацию нуклеаз и очищение от белковых примесей проводили с помощью протеиназы К в присутствии SDS. Экстракцию гДНК проводили смесью фенол-хлороформ.

Выделение вкДНК *M. intracellulare* и *M. avium* проводили без разрушения клеточной стенки: клетки бактерий инкубировались с ТЕ-буфером в присутствии ЭДТА, далее клетки были отделены от буфера путем центрифугирования. Надосадочную жидкость использовали для экстракции вкДНК аналогично протоколу выделения гДНК.

Качество и количество полученных образцов гДНК и вкДНК оценивали с помощью автоматического электрофореза на установке Agilent 2200 TapeStation. Количество гДНК в образцах *M. intracellulare* и *M. avium* было примерно одинаковым – 41 и 39,2 нг/мкл соответственно. Количество вкДНК составило 9,23 нг/мкл у *M. intracellulare* и 6,1 нг/мкл у *M. avium*, что соответственно в 4,4 и в 6,4 раза меньше, чем в случае гДНК (рис. 1).

Разрушение бактериальных клеток в популяции – процесс постоянный, что не исключает попадание гДНК в образцы вкДНК. Чтобы быть уверенными, что в образце находится преимущественно вкДНК, мы провели количественное определение 16S рРНК и SigA в образцах гДНК и вкДНК, полученных из клеток, предварительно обработанных моноазидом пропидия (PMAxx™). Количественное определение 16S рРНК и SigA проводили с помощью ПЦР-РВ. Краситель PMAxx™ используется для дифференциации живых и мертвых клеток благодаря его способности проникать через мембраны неживых клеток и связываться ковалентно с двуцепочечной ДНК. При фотолизе видимым светом PMAxx™ вызывает модификацию ДНК, что исключает

Таблица. Сравнение концентраций 16S рРНК и SigA по флуоресценции красителя
Table. Comparison of 16S rRNA and SigA concentrations by dye fluorescence

	SigA		16S рРНК	
	-	+	-	+
гДНК	1,88 ± 0,22	0,99 ± 0,19	1,33 ± 0,08	0,98 ± 0,035
вкДНК	0,0238 ± 0,0035	0,0055 ± 0,0003	0,025 ± 0,0032	0,0055 ± 0,002

возможность амплификации данной молекулы ДНК с помощью ПЦР. Схема эксперимента представлена на рис. 2.

Образцы вкДНК и гДНК *M. intracellulare* и *M. avium*, обработанные / не обработанные PMAxx™, выделялись параллельно. В качестве контроля использовали клетки *M. intracellulare*, подвергнутые нагреванию. После взаимодействия с PMAxx™ образцы вкДНК и гДНК использовались как матрица для амплификации 16S рРНК и SigA с помощью ПЦР-РВ (таблица). Количество 16S рРНК во фракциях гДНК необработанной PMAxx™ составило 1,88 ± 0,16 относительных единиц (о.е.), после взаимодействия с PMAxx™ значение снизилось до 0,99 ± 0,13 о.е. Количество SigA во фракциях гДНК необработанной PMAxx™ составило 1,36 ± 0,08 о.е., после взаимодействия с PMAxx™ значение снизилось до 0,98 ± 0,13 о.е. Таким образом, обработка PMAxx™ привела к количественному снижению 16S рРНК в 1,8 раза и SigA в 1,3 раза, что может быть связано с присутствием некоторого количества нежизнеспособных клеток в популяции с поврежденной мембраной, через которую проник PMAxx™ и связался с ДНК, так как, гДНК находится внутри жизнеспособной бактериальной клетки и PMAxx™ не взаимодействует с ней из-за своей неспособности проникать через клеточную стенку живых бактерий.

Количество 16S рРНК и SigA в образцах вкДНК, даже не обработанных PMAxx™, было обнаружено в меньших количествах по сравнению с гДНК: 0,0238 ± 0,0035 о.е. и 0,0215 ± 0,0011 о.е. соответственно. Обработка PMAxx™ привела к значительному снижению количества, более чем в 4 раза, как 16S рРНК, так и SigA в образце: 0,0045 ± 0,0018 о.е. и 0,0055 ± 0,0015 о.е. соответственно. Такое снижение 16S рРНК и SigA в образце вкДНК связано с тем, что вкДНК находится на поверхности бактериальной клетки и PMAxx™ может легко связаться с молекулой и модифицировать ее, в результате чего амплификации в ходе ПЦР-РВ не происходит. Также полученные данные подтверждают незначительное присутствие (загрязнение) гДНК в образце, что может быть связано с незначительным разрушением бактериальных клеток в ходе манипуляций.

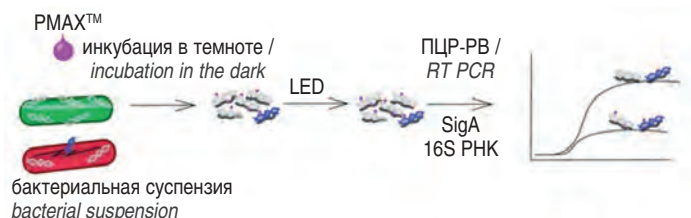


Рис. 2. Схема эксперимента с красителем PMAxx™. Зеленым окрашены жизнеспособные клетки, красным – клетки с поврежденной мембраной. Краситель (фиолетовый) действует с вкДНК (светло-серый цвет), а также с гДНК (синий цвет) поврежденных клеток. При облучении образца LED-излучением краситель ковалентно связывается с молекулами ДНК, вызывая их модификацию, и в дальнейшем препятствует амплификации данной молекулы ДНК с помощью ПЦР.

Fig. 2. Schematic of the PMAxx™ dye experiment. Viable cells are colored green, and cells with damaged membranes are colored red. The dye (violet) acts on cfDNA (light gray) and gDNA (blue) of damaged cells. When the sample is irradiated with LED light, the dye covalently binds to DNA molecules, causing their modification and, subsequently, preventing the amplification of this DNA molecule using PCR.

Заключение

Таким образом, мы продемонстрировали, что использованный протокол выделения вкДНК является эффективным, позволяет получить вкДНК с оптимальной концентрацией и чистотой.

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 / References

1. Arenas J, Tommassen J. Meningococcal Biofilm Formation: Let's Stick Together. *Trends Microbiol.* 2017;25(2):113-124. DOI: 10.1016/j.tim.2016.09.005
2. Turnbull L, Toyofuku M, Hynen AL, Kurosawa M, Pessi G, Petty NK, et al. Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nat Commun.* 2016 Apr 14;7:11220. DOI: 10.1038/ncomms11220
3. Deng B, Ghatak S, Sarkar S, Singh K, Das Ghatak P, Mathew-Steiner SS, et al. Novel Bacterial Diversity and Fragmented eDNA Identified in Hyperbiofilm-Forming *Pseudomonas aeruginosa* Rugose Small Colony Variant. *iScience.* 2020 Feb 21;23(2):100827. DOI: 10.1016/j.isci.2020.100827
4. Rose SJ, Babrak LM, Bermudez LE. *Mycobacterium avium* Possesses Extracellular DNA that Contributes to Biofilm Formation, Structural Integrity, and Tolerance to Antibiotics. *PLoS One.* 2015 May 26;10(5):e0128772. DOI: 10.1371/journal.pone.0128772
5. Barnes AM, Ballering KS, Leibman RS, Wells CL, Dunny GM. *Enterococcus faecalis* produces abundant extracellular structures containing DNA in the absence of cell lysis during early biofilm formation. *mBio.* 2012 Jul 24;3(4):e00193-12. DOI: 10.1128/mBio.00193-12
6. Rodriguez GM, Prados-Rosales R. Functions and importance of mycobacterial extracellular vesicles. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016 May;100(9):3887-92. DOI: 10.1007/s00253-016-7484-x
7. Marsollier L, Brodin P, Jackson M, Korduláková J, Tafelmeyer P, Carbonnelle E, et al. Impact of *Mycobacterium ulcerans* biofilm on transmissibility to ecological niches and Buruli ulcer pathogenesis. *PLoS Pathog.* 2007 May 4;3(5):e62. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030062
8. Rose SJ, Bermudez LE. Identification of Bicarbonate as a Trigger and Genes Involved with Extracellular DNA Export in Mycobacterial Biofilms. *mBio.* 2016 Dec 6;7(6):e01597-16. DOI: 10.1128/mBio.01597-16
9. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 1998 Jun 11;393(6685):537-44. DOI: 10.1038/31159
10. Stinear TP, Seemann T, Pidot S, Frigui W, Reyssset G, Garnier T, et al. Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer. *Genome Res.* 2007 Feb;17(2):192-200. DOI: 10.1101/gr.5942807
11. Stinear TP, Seemann T, Harrison PF, Jenkin GA, Davies JK, Johnson PD, et al. Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the

evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res.* 2008 May;18(5):729-41.

DOI: 10.1101/gr.075069.107

12. Fan X, Xie L, Li W, Xie J. Prophage-like elements present in *Mycobacterium* genomes. *BMC Genomics.* 2014 Mar 27;15(1):243. DOI: 10.1186/1471-2164-15-243
13. Wu J, Xi C. Evaluation of different methods for extracting extracellular DNA from the biofilm matrix. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Aug;75(16):5390-5. DOI: 10.1128/AEM.00400-09
14. Ghatak S, Muthukumar RB, Nachimuthu SK. A simple method of genomic DNA extraction from human samples for PCR-RFLP analysis. *J Biomol Tech.* 2013 Dec;24(4):224-31. DOI: 10.7171/jbt.13-2404-001

Информация о соавторах:

Савицкая Анна Геннадьевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник Государственного научного центра Российской Федерации «Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» РАН
ORCID: 000-0001-8519-020X

Хохлова Ольга Евгеньевна, доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, профессор факультета биологической безопасности ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ» Пущинский государственный естественно-научный институт

Винник Юрий Семёнович, Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей хирургии им. проф. М.И.Гульмана Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого

Теплякова Ольга Валериевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры общей хирургии им. проф. М.И.Гульмана Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого; врач-хирург Клинической больницы «РЖД-Медицина» г. Красноярск
ORCID: 0000-0003-0005-3316

Information about co-authors:

Anna G. Savitskaya, PhD in Biological Sciences, Researcher, M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov State Research Center of the Russian Federation Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
ORCID: 000-0001-8519-020X

Olga E Khokhlova, PhD, DSc (Biological Sciences), Associate Professor, Chief Researcher of the Laboratory of Antimicrobial Drugs of the Department of Molecular Microbiology of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Professor of the Faculty of Biological Safety of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "ROSBIOTECH" PushchGENI

Yury S. Vinnik, Honored Scientist of the Russian Federation, MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Professor M.I.Gulman Department of General Surgery of the Prof. V.F.Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University

Olga V. Teplyakova, MD, PhD, DSc, Professor of the Professor M.I.Gulman Department of General Surgery, Prof. V.F.Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University; Surgeon, Clinical Hospital "RZhD-Medicine" of the city of Krasnoyarsk
ORCID: 0000-0003-0005-3316

Способность медленно- и быстрорастущих штаммов бактерий рода *Mycobacterium* взаимодействовать с чужеродной внеклеточной ДНК

А.В.Ильинов^{1,2}, А.Г.Савицкая³, О.Е.Хохлова⁴, Ю.С.Винник¹, О.В.Теплякова^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Российская Федерация;

²Частное учреждение здравоохранения «Клиническая больница «РЖД-Медицина» г. Красноярск», Красноярск, Российская Федерация;

³ФГБУН ГНЦ Российской Федерации «Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» РАН, Москва, Российская Федерация;

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

Цель исследования. Изучить взаимодействие клеток медленно- и быстрорастущих штаммов микобактерий с чужеродной внеклеточной ДНК (вкДНК), оценить ее способность влиять на устойчивость клеток микобактерий к антимикробным препаратам.

Материалы и методы. В работе были использованы штаммы медленно- и быстрорастущих *Mycobacterium tuberculosis* var. БЦЖ Токио 172, *Mycobacterium intracellulare* 13950 и быстрорастущих микобактерий *Mycobacterium fortuitum* subsp. *fortuitum* ATCC 6841. Клетки микобактерий в начале экспоненциальной фазы роста, инкубировали с ДНК лосося на бульонных средах в течение 24 ч, отмывали и окрашивали оставшуюся на клетках вкДНК красителями SYTOX Green (SG) и CV-AM. Количество вкДНК оценивали методом проточной цитофлуориметрии. У штамма с наибольшим количественным изменением вкДНК определяли устойчивость к антибиотикам, механизм действия которых не предусматривает прямого взаимодействия с ДНК (амикацин и кларитромицин).

Результаты. Количество вкДНК у медленно- и быстрорастущих *M. tuberculosis* var. БЦЖ Токио 172 и *M. intracellulare* 13950 после инкубации с ДНК лосося не изменилось, в то время как у быстрорастущего штамма *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* ATCC 6841 оно увеличилось в 2,5 раза. Последующая инкубация *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* ATCC 6841 с антибиотиками в присутствии ДНК лосося показала, что концентрация ДНК лосося 310 нг/мл способствует увеличению устойчивости к амикацину, но не кларитромицину. Увеличение устойчивости к кларитромицину было выявлено только при концентрации ДНК лосося 3100 нг/мл и 10 мкг/мл кларитромицина.

Заключение. Быстрорастущие штаммы микобактерий более активно взаимодействуют с чужеродной вкДНК на начальных этапах роста (формирования биопленок), что способствует увеличению лекарственной устойчивости, в то время как медленно- и быстрорастущие штаммы практически не взаимодействуют с чужеродной ДНК на начальных этапах роста, что может быть связано с присутствием собственной вкДНК в необходимом количестве для данного этапа роста.

Ключевые слова: медленно- и быстрорастущие микобактерии, взаимодействие микобактерий, амикацин, кларитромицин, внеклеточная ДНК, биопленки

Для цитирования: Ильинов А.В., Савицкая А.Г., Хохлова О.Е., Винник Ю.С., Теплякова О.В. Способность медленно- и быстрорастущих штаммов бактерий рода *Mycobacterium* взаимодействовать с чужеродной внеклеточной ДНК. Бактериология. 2025; 10(3): 56–61. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-56-61

The ability of slow-growing and fast-growing strains of *Mycobacterium* to interact with foreign extracellular DNA (eDNA)

A.V.Ilinov^{1,2}, A.G.Savitskaya³, O.E.Khokhlova⁴, Yu.S.Vinnik¹, O.V.Teplyakova^{1,2}

Для корреспонденции:

Ильинов Александр Владимирович, врач-хирург, Клиническая больница «РЖД-Медицина» г. Красноярск; старший преподаватель кафедры общей хирургии им. проф. М.И.Гульмана Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого

Адрес: 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1
ORCID: 0000-0002-8247-1388

Статья поступила 10.04.2025, принята к печати 30.09.2025

For correspondence:

Aleksandr V. Ilinov, surgeon, Clinical Hospital "RZhD-Medicine" in Krasnoyarsk, senior lecturer of the Professor M.I.Gulman Department of General Surgery, V.F.Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University

Address: 1 Partizan Zheleznyak str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation
ORCID: 0000-0002-8247-1388

The article was received 10.04.2025, accepted for publication 30.09.2025

¹V.F.Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Krasnoyarsk, Russian Federation;

²Private Healthcare Institution «Clinical Hospital» of Russian Railways Medicine Krasnoyarsk, Krasnoyarsk, Russian Federation;

³M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov State Research Center of the Russian Federation Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation;

⁴State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Rospotrebnadzor, Obolensk, Russian Federation

Aim of the study. Study the possibility of foreign eDNA to interact with slow-growers and fast-growers mycobacteria, to estimate the effect of foreign eDNA (salmon DNA) on antibiotic resistance of mycobacteria of interest.

Materials and methods. Slow-growers mycobacteria *Mycobacterium tuberculosis* var. BCG Tokyo 172, *Mycobacterium intracellulare* 13950 and fast-growers mycobacteria *Mycobacterium fortuitum* subsp. *fortuitum* ATCC 6841. Mycobacterial cells, at the beginning of the exponential growth phase, were incubated with salmon DNA for 24 hours, cells were washed and stained with dyes SYTOX Green (SG) and CV-AM. Amount of eDNA was determined by cytoflowmetry. The strain with the greatest shift quantity of eDNA was tested for resistance to amikacin and clarithromycin.

Results. The eDNA amount of slow growers (*M. tuberculosis* var. BCG Tokyo 172 and *M. intracellulare* 13950) did not change after incubation with salmon DNA, while the fast-growing strain *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* ATCC 6841 the amount of eDNA increased by 2.5 times. We revealed resistance of *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* ATCC 6841 to amikacin in the presence of 310 ng/ml but not to clarithromycin. Clarithromycin resistance was detected only at 3100 ng/ml salmon DNA and 10 µg/ml clarithromycin.

Conclusion. Fast-growing mycobacterial strains interact more actively with foreign eDNA at the initial stages of growth (biofilm formation); eDNA promotes increased drug resistance. While slow-growing strains practically do not interact with foreign eDNA at the initial stages of growth, this may be due to the presence of their own eDNA in the required amount for the studied stage of growth.

Key words: mycobacterium, antibiotic resistance, bacterial, clarithromycin, extracellular DNA, biofilms

For citation: Ilinov A.V., Savitskaya A.G., Khokhlova O.E., [Vinnik Yu.S.], Teplyakova O.V. The ability of slow-growing and fast-growing strains of *Mycobacterium* to interact with foreign extracellular DNA (eDNA). Bacteriology. 2025; 10(3): 56–61. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-56-61

Образование биопленок дает бактериям преимущество в росте, повышая устойчивость к меняющимся и/или агрессивным условиям окружающей среды, в т.ч. к антибиотикам и действию иммунной системы, что позволяет микроорганизмам сохраняться длительное время в макроорганизме [1–6]. Все представители рода *Mycobacterium* способны формировать биопленки. Биопленки микобактерий могут быть пелликулярного типа (на границе жидкость–воздух) и классическими (на границе субстрат–жидкость). Вне зависимости от типа биопленки в составе матрикса микобактерий обнаруживают внеклеточную ДНК (вкДНК), белки, липиды и экзополисахариды. Интересно, что состав матрикса у представителей рода *Mycobacterium* в количественно-временном отношении различается. Например, вкДНК у медленнорастущих микобактерий появляется в значимых количествах на первых этапах формирования биопленки, в то время как у быстрорастущих представителей микобактерий вкДНК в значимых количествах обнаруживается только в зрелых биопленках [1, 2, 7]. Данное различие связано с тем, что у медленнорастущих микобактерий вкДНК участвует в формировании архитектуры биопленок уже с первых этапов роста, в то время как у быстрорастущих микобактерий на начальных этапах формирования биопленок большую роль играют гликопептидолипиды и миколовые кислоты [1, 7]. Бактерии способны использовать не только собственную вкДНК, но и вкДНК, которая появляется в результате распада иммунных клеток, что способствует формированию биопленки и повышению лекарственной устойчивости бактерий [2–4].

В данной работе мы определили исходное количество вкДНК у представителей медленнорастущих и быстрорастущих микобактерий в начале экспоненциальной фазы роста.

Затем определили количественные изменения вкДНК быстрорастущих и медленнорастущих микобактерий при добавлении чужеродной ДНК (ДНК лосося (лДНК)). У штамма, который показал наибольшее количественное изменение вкДНК, оценили влияние чужеродной ДНК на устойчивость клеток микобактерий к амикацину и кларитромицину. Обнаружено, что при внесении чужеродной ДНК наибольшие изменения количества вкДНК были у быстрорастущего представителя микобактерий *M. fortuitum*. Внесение лДНК в качестве чужеродной ДНК приводит к повышению лекарственной устойчивости.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и питательные среды

В работе использовались представители медленнорастущих штаммов *M. tuberculosis* var. БЦЖ Tokyo 172, *M. intracellulare* 13950 и быстрорастущих штаммов микобактерий *Mycobacterium fortuitum* subsp. *fortuitum* ATCC 6841. Культивирование бактерий проводили как на жидких, так и на твердых питательных средах при температуре 37°C в аэробных условиях в течение 72 ч. В качестве жидких питательных сред использовался питательный бульон Middlebrook 7H9 (BD, Franklin Lakes, Нидерланды) с добавлением 0,2% (об./об.) глицерина, 0,05% (об./об.) Tween 80 (MP Biomedicals, США) и 10% OADC (ADC с добавлением 0,06% (об./об.) олеиновой кислоты) (агар 7H11-OADC). Также культивирование проводили на бульонной среде 7H9, обогащенной ADC (бульон 7H9-ADC) (5% бычьего сывороточного альбумина (Wako Pure Chemical Industries, Япония), 0,81% NaCl и 2% D-глюкозы).

Для роста на твердых средах использовали агар *Mycobacteria* 7H11 (BD, Franklin Lakes, Нидерланды) с добавлением 0,5% (об./об.) глицерина и добавлением в 10% OADC (обогащение ADC с добавлением 0,06% (об./об.) олеиновой кислоты) (агар 7H11-OADC).

Обнаружение вкДНК

Обнаружение вкДНК на поверхности жизнеспособных клеток проводилось с помощью красителей CV-AM (Calcein Violet-Acetoxymethyl ester), индикатора присутствия эстеразы, маркера жизнеспособных бактерий (рис. 1), и SYTOX Green (SG) (Life-Technologies Corporation, США) который не проникает через неповрежденную клеточную мембрану, т.е. окрашивает ДНК (вкДНК). Красители растворяли согласно инструкции производителя (1 мг CV-AM в 250 мкл диметилсульфоксида (ДМСО); SG разбавили из исходного раствора производителя (5 мМ) до конечной концентрации 50 мкМ также с помощью ДМСО. Красители хранили при температуре -20°C.

Бактериальную культуру ($OD_{600} = 0,01$) вносили в две пробирки Эппендорф по 1 мл, в одну из них был добавлен 1 мкл (2 Ед) DNase I (Sigma-Aldrich, США). Образцы инкубировали в течение 12 ч при 37°C на роторной мешалке (4 об./мин). По завершении в чистую пробирку Эппендорф вносили по 100 мкл бактериальной суспензии после инкубации с DNase I, затем по 5 мкл красителя CV-AM и инкубировали в течение 60 мин при 37°C. По окончании инкубации добавляли 1 мкл красителя SG с дальнейшей инкубацией в течение 15 мин при комнатной температуре. Для удаления избыточного количества красителя образцы однократно промывали питательной средой 7H9-ADC. Образцы *M. tuberculosis* H37Rv дополнительно фиксировали 4%-м параформальдегидом в фосфатном буфере PBS (phosphate-buffered saline). Далее все образцы суспендировали в буфере, содержащем 150 мкМ NaCl и 0,05% Tween 80. Анализ флуоресценции окрашенных клеток проводился на проточном цитометре NovoCyte (ACEA Biosciences Inc., США) при длинах волн возбуждения 488 нм (SG) и 405 нм (CV-AM).

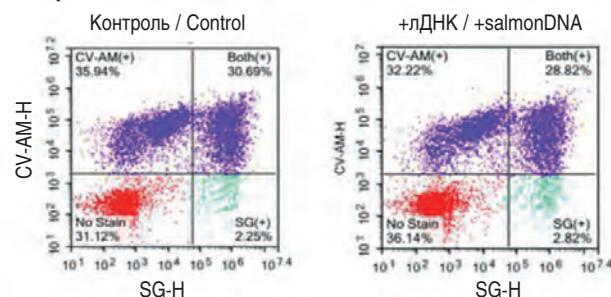
Инкубация с ДНК лосося

Микобактерии культивировали на жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 при температуре 37°C до оптической плотности $OD_{600} = 0,01$. Полученную бактериальную культуру разделяли на 2 образца по 7 мл. В один из них добавляли лДНК эквивалентно рассчитанному количеству гДНК. Количество гДНК рассчитывали исходя из того, что 1 бактерия содержит 3,1 фг ($3,1 \cdot 10^{-15}$ г) ДНК, в бактериальной суспензии с оптической плотностью 1 может быть обнаружено 10^8 микобактерий/мл, таким образом, в 1 мл бактериальной суспензии с оптической плотностью 1 содержится 310 нг ДНК. Образцы инкубировали в течение 24 ч при 37°C с вращением на роторе при скорости 4 об./мин. Далее проводили обнаружение вкДНК на поверхности жизнеспособных клеток с помощью красителей CV-AM, как описано выше.

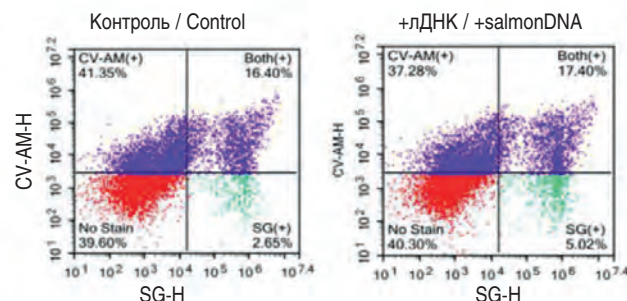
Устойчивость микобактерий к лекарственным препаратам

В работе использовали антибиотики амикацин и кларитромицин (Wako Pure Chemical Industries, Япония). Стоковые растворы антибиотиков стерилизовали фильтрованием

А БЦЖ / BCG



Б *M. intracellulare*



В *M. fortuitum*

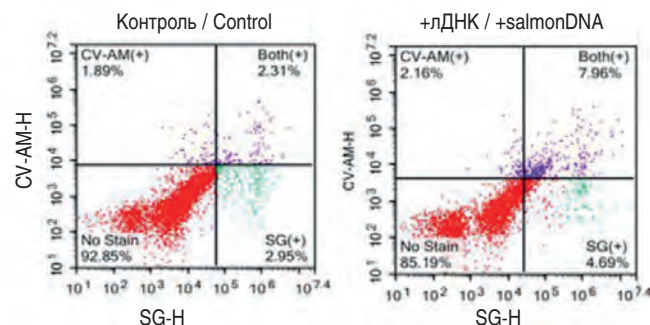


Рис. 1. Изменение количества вкДНК БЦЖ (А), *M. intracellulare* (Б) и *M. fortuitum* (С) в контроле (контроль) и после инкубации с чужеродной ДНК (+лДНК). Секция CV-AM показывает процент жизнеспособных клеток в популяции, секция SG – процент мертвых клеток в популяции, секция Both – процент клеток с двойным окрашиванием, т.е. жизнеспособных клеток, несущих вкДНК.

Fig. 1. Changes in the amount of BCG (A), *M. intracellulare* (B) and *M. fortuitum* (C) extracellular DNA in the control and after incubation with foreign DNA (+salmonDNA). The CV-AM section shows the percentage of viable cells in the population; the SG section shows the percentage of dead cells in the population. Both sections show the percentage of double-stained cells, i.e. viable cells carrying extracellular DNA.

через мембрану с размером пор 0,45 мкм. До момента использования растворы хранили при -20°C. Клетки микобактерий инкубировали в бульоне 7H9/ADC до оптической плотности $OD_{600} = 0,1$. Затем культуры были разбавлены до оптической плотности $OD_{600} = 0,001$ с помощью стерильной свежей питательной среды 7H9/ADC, после чего была добавлена DNase I в количестве 0,25 Ед/мл. Инкубация продолжалась еще в течение 72 ч при 37°C на качалке, образцы без DNase I были культивированы аналогично.

По завершении инкубации (с DNase I или без нее) бактериальную суспензию разбавляли свежей питательной средой 7H9/ADC до оптической плотности $OD_{600} = 0,001$. В подготовленные таким образом бактериальные суспензии добавлялись, бактериальные культуры оставляли инкубироваться при 37°C на качалке в течение 6 и 24 ч. Контрольные

образцы без лекарственных препаратов были подготовлены в тех же условиях.

По завершении инкубации жизнеспособность клеток определяли с помощью метода серийных разведений.

Сразу после окончания культивирования микобактерий в питательной среде с антибиотиками / противотуберкулезными препаратами бактериальные клетки однократно отмывали от питательной среды, содержащей лекарственные препараты, стерильной водой и центрифугировали при 3500 об./мин. Серийные разведения проводили согласно методическим указаниям «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» (МУК 4.2.1890-04). Инокулированные агаровые среды (7H11-OADC) инкубировали при 37°C в течение 3 нед. Далее проводили учет выросших клеток.

Результаты исследования

Присутствие вкДНК у микобактерий и ее положительное влияние на способность формировать биопленки, что, в свою очередь, способствует увеличению лекарственной устойчивости микобактерий, показаны на примере как быстро-, так и медленно-растущих представителей рода [1, 2]. Бактерии способны использовать как собственную вкДНК, которая высвобождается в результате гибели бактериальных клеток, так и чужеродную. Например, при возникновении инфекционного процесса *M. tuberculosis* способен использовать вкДНК, которая высвобождается в результате гибели фагоцитов [3].

Несмотря на то, что вкДНК может быть обнаружена у всех представителей рода *Mycobacterium*, ее значение для процесса формирования биопленок может различаться. У быстро-растущих микобактерий на начальных этапах формирования биопленок более важными молекулами являются экзополисахариды, а вкДНК в больших количествах обнаруживается уже в зрелых биопленках. При формировании биопленок медленно-растущими бактериями вкДНК выполняет важные функции с начальных этапов [1, 2]. Интересно оценить, способствует ли добавление чужеродной ДНК адсорбции этой ДНК на поверхности бактериальных клеток и происходит ли повышение лекарственной устойчивости [3, 4].

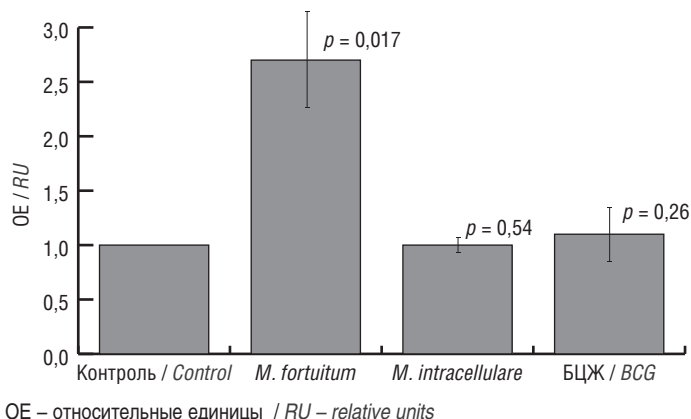


Рис. 2. Изменение количества вкДНК у микобактерий после инкубации с ДНК лосося.
 Fig. 2. Change in the amount of extracellular DNA in mycobacteria after incubation with salmon DNA.

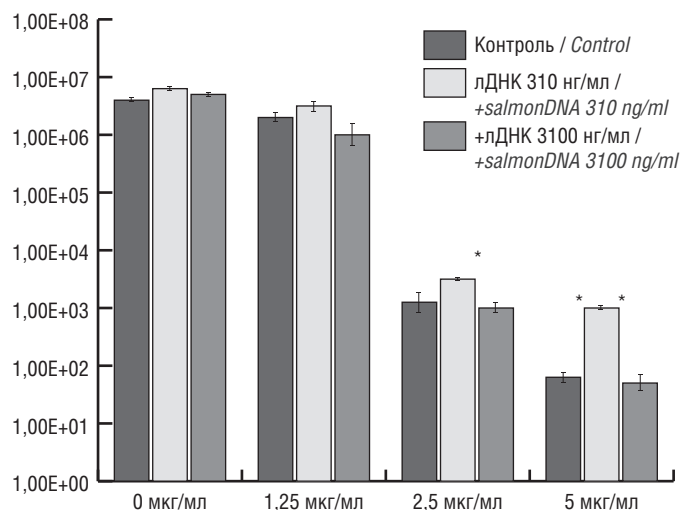


Рис. 3. Влияние ДНК лосося на устойчивость штамма *M. fortuitum* к амикацину, * $p < 0,05$.
 Fig. 3. Effect of salmon DNA on the resistance of *M. fortuitum* strain to amikacin, * $p < 0.05$.

Сначала мы определили базовый уровень вкДНК у медленно-растущих (*M. tuberculosis* var. БЦЖ, *M. intracellulare*) и быстро-растущих микобактерий (*M. fortuitum*). Бактерии культивировали на бульонной среде до экспоненциальной фазы роста, затем клетки окрашивали двумя красителями – SG и CV-AM. Определив исходное количество вкДНК у микобактерий, мы исследовали количественные колебания вкДНК микобактерий после инкубации с чужеродной ДНК (лДНК). Количественное определение вкДНК проводили методом проточной цитофлуометрии (рис. 1).

Изменение количества вкДНК у БЦЖ, *M. intracellulare* и *M. fortuitum* после инкубации с лДНК рассчитывали в относительных единицах (о.е.) относительно контроля, данные представлены на рис. 2.

Анализ результатов показал, что добавление чужеродной ДНК (лДНК) не привело к изменению количества вкДНК у штаммов БЦЖ и *M. intracellulare* по сравнению с контролем. В то же время инкубация быстро-растущего штамма *M. fortuitum* с лДНК привела к увеличению количества вкДНК в 2,5 раза по сравнению с контролем (рис. 2).

Поскольку увеличение количества вкДНК после инкубации с лДНК наблюдалось только у штамма *M. fortuitum*, дальнейшее исследование влияния лДНК на устойчивость к лекарственным препаратам проводилось на этом штамме. В качестве антимикробных агентов использовали амикацин и кларитромицин, механизм действия которых непосредственно не затрагивает ДНК. лДНК вносили в двух концентрациях, 310 и 3100 нг/мл, инкубировали с клетками *M. fortuitum*, затем клетки отмывали и вносили антибиотики в нескольких концентрациях на 24 ч, после чего клетки отмывали от остатков антибиотика и определяли КОЕ/мл.

Инкубация *M. fortuitum* с 1,25 мкг/мл амикацина в течение 24 ч не выявила различия с контролем при внесении лДНК в количестве 310 нг/мл, в то время как внесение лДНК в количестве 3100 нг/мл дало интересный результат – привело к снижению КОЕ/мл по сравнению с контролем. Увеличение концентрации амикацина до 2,5 мкг/мл выявило повышение

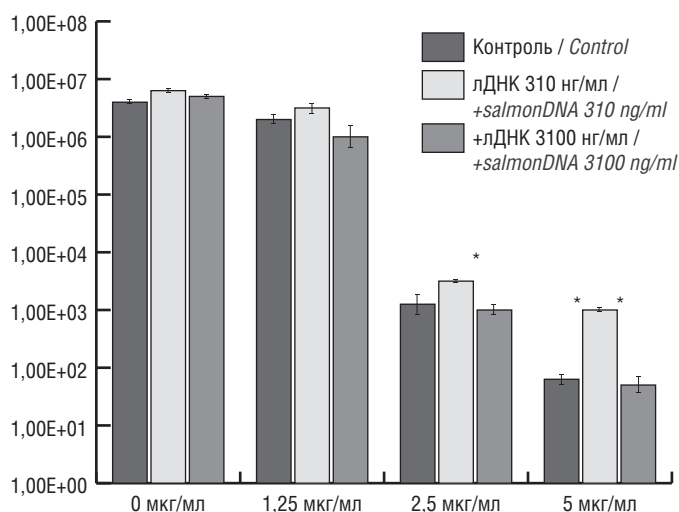


Рис. 4. Влияние ДНК лосося на устойчивость штамма *M. fortuitum* к кларитромицину.

Fig. 4. Effect of salmon DNA on clarithromycin resistance of *M. fortuitum* strain.

устойчивости в культуре, куда была внесена лДНК в количестве 310 нг/мл, относительно контроля, в то время как внесение лДНК в количестве 3100 нг/мл не привело к изменению КОЕ/мл, показатели были сопоставимы с контролем.

Таким образом, инкубация в среде с амикацином показала, что присутствие лДНК в количестве 310 нг/мл приводит к увеличению устойчивости бактерий к антибиотику, в то время как концентрация 3100 нг/мл не оказывает влияния на устойчивость *M. fortuitum* к амикацину относительно контроля (рис. 3).

Интересно, что 310 нг/мл лДНК оказывает положительный эффект на количество жизнеспособных клеток *M. fortuitum* при концентрации амикацина 2,5 и 5 мкг/мл, в то время как 3100 нг/мл лДНК не оказывает никакого эффекта.

Инкубация *M. fortuitum* с кларитромицином в концентрациях 2,5 мкг/мл, 5 мкг/мл привела к равному снижению КОЕ/мл в контроле и в присутствии лДНК в количестве 310 и 3100 нг/мл (рис. 4). При повышении концентрации кларитромицина до 10 мкг/мл наблюдалось увеличение количества жизнеспособных клеток только при добавлении 3100 нг/мл лДНК, в то время как КОЕ/мл при 310 нг/мл лДНК было сопоставимо с контролем.

Обсуждение

Отсутствие количественного увеличения вкДНК по сравнению с контролем у медленно растущих представителей микобактерий БЦЖ и *M. intracellulare* может быть связано с присутствием собственной вкДНК в необходимом для данной стадии роста количестве, конкурирующей с лДНК. Увеличение количества вкДНК у *M. fortuitum*, возможно, обусловлено изначально минимальным количеством микобактериальной вкДНК, что способствовало активному взаимодействию лДНК с поверхностью бактериальных клеток *M. fortuitum*.

Амикацин является полусинтетическим антибиотиком из группы аминогликозидов. Механизм его действия связан с

блокировкой синтеза белка. Амикацин связывается с 30S-субъединицей рибосом, блокирует образование комплекса транспортной и матричной РНК, вследствие чего нарушается синтез белка в клетке бактерий. Внесение лДНК в концентрации 310 нг/мл привело к увеличению устойчивости *M. fortuitum* к амикацину в концентрации 5 мкг/мл, в то время как внесение 3100 нг/мл лДНК не оказывало никакого эффекта по сравнению с контролем. Возможно, добавление лДНК в концентрации 3100 нг/мл является избытком для бактериальных клеток и не способствует формированию пелликулярных биопленок, напротив, их формирование ингибирует катионная природа лДНК, обволакивающей клетки микобактерий и препятствующей их взаимодействию.

Кларитромицин относится к группе макролидов, механизм действия которого обусловлен связыванием 23S РНК в месте туннеля выхода полипептида 50S рибосомальной субъединицы, что препятствует сборке рибосом, диссоциации тРНК и, как следствие, приводит к ингибированию белкового синтеза [8]. Внесение лДНК в количестве 310 нг/мл не оказало влияния на устойчивость *M. fortuitum* к антибиотику. Увеличение устойчивости наблюдалось только в одном случае – 3100 нг/мл лДНК при 10 мкг/мл кларитромицина. Отсутствие эффекта при других исследуемых концентрациях кларитромицина может быть связано с непосредственным влиянием антибиотика на молекулярные механизмы формирования биопленки. Способность кларитромицина ингибировать формирование биопленок была показана на примере *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella* Typhimurium и *Staphylococcus aureus* [9–11]. Инкубация *S. Typhimurium* с кларитромицином в различных концентрациях выявила преобладающее влияние на дезинтеграцию биопленки (вплоть до концентрации антибиотика 1,56 мкМ), а не на жизнеспособность бактериальных клеток [11]. Возможно, кларитромицин способствует переходу клетки в состояние кислородного истощения и препятствует окислительному фосфорилированию, влияет на ферменты, участвующие в цепи переноса электронов бактерий, что также мешает формированию биопленки [9–11].

Еще одним объяснением отсутствия эффекта лДНК может быть заряд кларитромицина. Адсорбция кларитромицина может быть обусловлена электростатическим между зарядом поверхности бактериальной клетки и зарядом молекулы антибиотика. При значениях pH питательных сред, используемых в исследовании (~7,0), группа $\text{NH}(\text{CH}_3)_2$ в молекуле кларитромицина заряжена положительно, в то время как клеточная стенка несет отрицательный заряд, что способствует взаимодействию между молекулой антибиотика и клеточной стенкой микобактерии [12].

Заключение

Мы показали, что внесение чужеродной ДНК лосося не привело к количественному изменению вкДНК у медленно растущих представителей микобактерий, использованных в данной работе. Тогда как быстрорастущие представители микобактерий имеют незначительное количество вкДНК на ранних этапах формирования биопленки: например, у *M. smegmatis* для начальной адгезии к поверхности во время

образования биопленки важны гликопептидолипиды и миколовые кислоты, а не вкДНК [13]. Однако мы показали, что внесение лДНК приводит к количественному увеличению вкДНК в 2,5 раза у *M. fortuitum*, представителя быстро-растущих микобактерий (рис. 1), что обусловлено изначально минимальным количеством микобактериальной вкДНК. Наличие свободных сайтов связывания облегчает взаимодействие лДНК с поверхностью бактериальных клеток *M. fortuitum*, более быстрому формированию биопленок и, как следствие, увеличению лекарственной устойчивости к амикацину. Таким образом, несмотря на то, что быстро-растущие микобактерии на начальных этапах формирования биопленок используют молекулы, отличные от вкДНК, внесение чужеродной ДНК ускоряет процесс формирования биопленок и способствует увеличению устойчивости к анти-микробным препаратам.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

- Rose SJ, Babrak LM, Bermudez LE. *Mycobacterium avium* Possesses Extracellular DNA that Contributes to Biofilm Formation, Structural Integrity, and Tolerance to Antibiotics. *PLoS One*. 2015 May 26;10(5):e0128772. DOI: 10.1371/journal.pone.0128772
- Vega-Dominguez P, Peterson E, Pan M, Di Maio A, Singh S, Umapathy S, et al. Biofilms of the non-tuberculous *Mycobacterium chelonae* form an extracellular matrix and display distinct expression patterns. *Cell Surf*. 2020 Aug 5;6:100043. DOI: 10.1016/j.tcsu.2020.100043
- Kirov SM, Webb JS, O'May CY, Reid DW, Woo JKK, Rice SA, et al. Biofilm differentiation and dispersal in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Microbiology (Reading)*. 2007 Oct;153(Pt 10):3264-3274. DOI: 10.1099/mic.0.2007/009092-0
- Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog*. 2008 Nov;4(11):e1000213. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000213
- Parvin F, Hu H, Whiteley GS, Glasbey T, Vickery K. Difficulty in removing biofilm from dry surfaces. *J Hosp Infect*. 2019 Dec;103(4):465-467. DOI: 10.1016/j.jhin.2019.07.005
- Kaplan JB, LoVetri K, Cardona ST, Madhyastha S, Sadovskaya I, Jabbouri S, et al. Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. *J Antibiot (Tokyo)*. 2012 Feb;65(2):73-7. DOI: 10.1038/ja.2011.113
- Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. 2002 Feb 22;295(5559):1487. DOI: 10.1126/science.295.5559.1487
- Zhang W, Li Z, Sun Y, Cui P, Liang J, Xing Q, et al. Cryo-EM structure of *Mycobacterium tuberculosis* 50S ribosomal subunit bound with clarithromycin reveals dynamic and specific interactions with macrolides. *Emerg Microbes Infect*. 2022 Dec;11(1):293-305. DOI: 10.1080/22221751.2021.2022439
- Bugli F, Palmieri V, Torelli R, Papi M, De Spirito M, Cacaci M, et al. *In vitro* effect of clarithromycin and alginate lyase against *Helicobacter pylori* biofilm. *Biotechnol Prog*. 2016 Nov;32(6):1584-1591. DOI: 10.1002/btpr.2339
- Zeng M, Li ZY, Ma J, Cao PP, Wang H, Cui YH, et al. Clarithromycin and dexamethasone show similar anti-inflammatory effects on distinct phenotypic chronic rhinosinusitis: an explant model study. *BMC Immunol*. 2015 Jun 6;16:37. DOI: 10.1186/s12865-015-0096-x
- Zafar M, Jahan H, Shafeeq S, Nimitz M, Jänsch L, Römmling U, et al. Clarithromycin Exerts an Antibiofilm Effect against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium *rdar* Biofilm Formation and Transforms the Physiology towards an Apparent Oxygen-Depleted Energy and Carbon Metabolism. *Infect Immun*. 2020 Oct 19;88(11):e00510-20. DOI: 10.1128/IAI.00510-20
- Rodríguez-López L, Santás-Miguel V, Cela-Dablanca R, Núñez-Delgado A, Álvarez-Rodríguez E, Rodríguez-Seijo A, et al. Clarithromycin as soil and environmental pollutant: Adsorption-desorption processes and influence of pH. *Environ Res*. 2023 Sep 15;233:116520. DOI: 10.1016/j.envres.2023.116520
- Recht J, Kolter R. Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*. 2001 Oct;183(19):5718-24. DOI: 10.1128/JB.183.19.5718-5724.2001

Информация о соавторах:

Савицкая Анна Геннадьевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник Государственного научного центра Российской Федерации «Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» РАН
ORCID: 000-0001-8519-020X

Хохлова Ольга Евгеньевна, доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора; профессор факультета биологической безопасности «РОСБИОТЕХ» ПушчГЕНИ
ORCID: 0000-0002-2829-5117

Винник Юрий Семёнович, Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей хирургии им. проф. М.И.Гульмана Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого
ORCID: 0000-0002-8995-2862

Теплякова Ольга Валериевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры общей хирургии им. проф. М.И.Гульмана Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого; врач-хирург Клинической больницы «РЖД-Медицина» г. Красноярск
ORCID: 0000-0003-0005-3316

Information about co-authors:

Anna G. Savitskaya, PhD in Biological Sciences, Researcher, M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov State Research Center of the Russian Federation Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences
ORCID: 000-0001-8519-020X

Olga E. Khokhlova, PhD, DSc (Biological Sciences), Associate Professor, Chief Researcher of the Laboratory of Antimicrobial Drugs of the Department of Molecular Microbiology of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Professor of the Faculty of Biological Safety of the "ROSBIOTECH" PushchGENI
ORCID: 0000-0002-2829-5117

Yury S. Vinnik, Honored Scientist of the Russian Federation, MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Professor M.I.Gulman Department of General Surgery, V.F.Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University
ORCID: 0000-0002-8995-2862

Olga V. Teplyakova, MD, PhD, DSc, Professor of the Professor M.I.Gulman Department of General Surgery, V.F.Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University; Surgeon, Clinical Hospital "RZhD-Medicine" of the city of Krasnoyarsk
ORCID: 0000-0003-0005-3316

Оценка эффективности применения ДагХром Клебсиелла агара

Р.Ю.Юнусова¹, В.Г.Горелова², Е.А.Воропаева¹, Е.И.Лиханская¹, Т.А.Скирда¹, А.М.Бичучер¹,
И.Г.Мартыненко¹, И.А.Полилова³, А.В.Мещерякова³, М.И.Глухова⁴, С.Ю.Комбарова¹

¹ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация;

²ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Махачкала, Российская Федерация;

³ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница №2 Департамента здравоохранения г. Москвы», Российская Федерация;

⁴ОАНО ВО «Московский психолого-социальный университет», Москва, Российская Федерация

Бактерии рода *Klebsiella*, способные вызывать широкий спектр заболеваний, часто являются возбудителями инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и отличаются высоким уровнем устойчивости к антибиотикам. Для своевременной постановки диагноза и проведения эффективных терапевтических и противоэпидемических мероприятий необходимо ускоренное выявление бактерий этого рода.

Целью работы явилась оценка эффективности применения хромогенной питательной среды ДагХром Клебсиелла агар для одноэтапного выделения и идентификации клебсиелл.

Материалы и методы. Исследовано 20 бактериальных культур, выделенных в ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница №2 Департамента здравоохранения г. Москвы» при посеве клинического материала (мазки из носоглотки) от 20 пациентов с ВИЧ-инфекцией на среде Uriselect 4 (BioRad, США). Чистые культуры с Uriselect 4 пересеивали параллельно на среды Эндо и ДагХром Клебсиелла агар.

Результаты. При идентификации культур с помощью ДагХром Клебсиелла агара и предложенного алгоритма было установлено, что из 17 культур рода *Klebsiella* 15 культур относятся к виду *K. pneumoniae* и 2 культуры – к *K. oxytoca*. Исследование трех культур, не принадлежавших к роду *Klebsiella*, позволило идентифицировать их как *Serratia marcescens*.

Заключение. Предложен алгоритм идентификации клебсиелл до вида с использованием ДагХром Клебсиелла агара, значительно сокращающий время исследования по сравнению с использованием общепринятой среды Эндо (48 ч и 3–5 суток соответственно). ДагХром Клебсиелла агар имеет перспективу применения в практической бактериологии, поскольку значительно сокращает и упрощает исследование.

Ключевые слова: *Klebsiella*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. mobilis*, хромогенная питательная среда, условно-патогенные микроорганизмы, инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, ДагХром Клебсиелла агар

Для цитирования: Юнусова Р.Ю., Горелова В.Г., Воропаева Е.А., Лиханская Е.И., Скирда Т.А., Бичучер А.М., Мартыненко И.Г., Полилова И.А., Мещерякова А.В., Глухова М.И., Комбарова С.Ю. Оценка эффективности применения ДагХром Клебсиелла агара. Бактериология. 2025; 10(3): 62–70. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-62-70

The prospects of using *Klebsiella* chrom agar in modern practical microbiology

R.Yu.Yunusova¹, V.G.Gorelova², E.A.Voropaeva¹, E.I.Likhanskaya¹, T.A.Skirda¹, A.M.Bichucher¹,
I.G.Martynenko¹, I.A.Polilova³, A.V.Meshcheryakova³, M.I.Glukhova⁴, S.Yu.Kombarova¹

¹G.N.Gabrichesky Research Institute for Epidemiology and Microbiology of Rosпотребнадзор, Moscow, Russian Federation;

²Dagestan State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Makhachkala, Russian Federation;

³Infectious Clinical Hospital No 2 of the Moscow Department of Health, Moscow, Russian Federation;

⁴Moscow Psychological and Social University, Moscow, Russian Federation

Для корреспонденции:

Юнусова Раисат Юнусовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории коковых инфекций Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора

Адрес: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10

Статья поступила 17.01.2025, принята к печати 30.09.2025

For correspondence:

Raisat Yu. Yunusova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher at the Laboratory of Coccal Infections, G.N.Gabrichesky Research Institute for Epidemiology and Microbiology of Rosпотребнадзор

Address: 10 Admiral Makarov str., Moscow, 125212, Russian Federation

The article was received 17.01.2025, accepted for publication 30.09.2025

The *Klebsiella* bacteria, which can cause a wide range of diseases, are often the cause of healthcare-associated infections, and have a high level of antibiotic resistance. For a timely diagnosis and effective therapeutic measures, the accelerated detection of this bacteria species is necessary.

The purpose of the work was to evaluate the effectiveness of the chromogenic medium DagChrom *Klebsiella* agar for the one-step isolation and identification of *Klebsiella* species.

Materials and methods. Twenty bacterial cultures isolated at the Infectious Clinical Hospital No 2 of Moscow by seeding clinical material (nasopharyngeal swabs) from 20 patients with HIV infection on the Uriselect 4 medium (BioRad, USA) were studied.

Results. When identifying the cultures using DagChrom *Klebsiella* agar and the proposed algorithm, it was determined that of the 17 *Klebsiella* strains, 15 belonged to *K. pneumoniae* and 2 – to *K. oxytoca*. Three strains, which do not belong to the *Klebsiella*, were identified as *Serratia marcescens*.

Conclusion. A proposed identification algorithm for *Klebsiella* species using DagChrom *Klebsiella* agar significantly reduces the time for identification compared to the commonly used Endo medium (48 hours versus 3–5 days, respectively). DagChrom *Klebsiella* agar has a prospect of application for practical bacteriology applications as it significantly reduces and simplifies the study.

Key words: bacteria of the genus *Klebsiella*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. mobilis*, chromogenic culture medium, opportunistic microorganisms, healthcare-associated infections, DagChrom *Klebsiella* Agar

For citation: Yunusova R.Yu., Gorelova V.G., Voropaeva E.A., Likhanskaya E.I., Skirida T.A., Bichucher A.M., Martynenko I.G., Polilova I.A., Meshcheryakova A.V., Glukhova M.I., Kombarova S.Yu. The prospects of using *Klebsiella chrom agar* in modern practical microbiology. Bacteriology. 2025; 10(3): 62–70. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-62-70

Бактерии рода *Klebsiella* – убиквитарные микроорганизмы, входящие в состав факультативной микрофлоры желудочно-кишечного тракта и верхних дыхательных путей. В определенных условиях они способны стать этиологическими агентами ряда инфекций у взрослых и детей, как госпитальных (пневмония, катетер-ассоциированные и хирургические инфекции, инфекции мочеполового тракта, менингит, бактериемия), так и внегоспитальных (пневмония, инфекции мочеполового тракта, абсцесс печени, бактериемия) [1–3]. Основными возбудителями заболеваний человека из представителей рода *Klebsiella* являются *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* и *K. mobilis*. Наибольшую значимость представляет *K. pneumoniae*, ответственная за 75–86% всех случаев клебсиеллезных инфекций [4].

K. pneumoniae относится к числу ESKAPE-патогенов (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp.), отличающихся высоким уровнем устойчивости к антибиотикам. Эти бактерии являются возбудителями инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), и могут быть смертельно опасны для людей в критическом состоянии и с ослабленным иммунитетом. Широкое распространение ИСМП, вызванных клебсиеллами, наносит значительный ущерб здоровью новорожденных и населения в целом, экономике и демографической ситуации в разных странах [5]. В последние годы многие штаммы *K. pneumoniae* приобрели способность продуцировать ферменты – β-лактамазы, у некоторых отмечается наличие суперфермента, известного как NDM-1, кодируемого геном *blaNDM-1*, что увеличило их устойчивость к пенициллину, цефалоспорином и карбапенемам. Растущая распространенность устойчивых к карбапенемам *K. pneumoniae* представляет собой серьезную проблему [6–9].

Пандемия, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, показала, что значимой причиной летальных исходов у людей, перенесших COVID-19, стали внутрибольничные инфекции. Было отмечено, что 30% пациентов умирали в первые 3 дня от дыхательной недостаточности, 70% умирали позже от сепсиса, вызванного внутрибольничной инфекцией. Наибольшую опасность среди возбудителей внутрибольничной инфекции, относящихся к грамотрица-

тельным микроорганизмам, представляли бактерии рода *Klebsiella* [10].

В связи с вышеизложенным актуальна разработка ускоренных и специфичных алгоритмов лабораторной диагностики бактерий рода *Klebsiella* с целью своевременного проведения эффективных терапевтических и противоэпидемических мероприятий. В частности, встает вопрос разработки и применения питательных сред нового поколения для ускоренного выделения и идентификации бактерий рода *Klebsiella*.

В мировой бактериологической практике широко используются хромогенные питательные среды (ХПС), принцип действия которых основан на выявлении высокоспецифичных ферментов у исследуемых микроорганизмов с помощью хромогенных субстратов. Экономический эффект колоссален – это сокращение времени выявления возбудителя и экономия трудовых и финансовых ресурсов. Однако ферментативные активности ксебсиелл, которые дают цветную реакцию, характерны и для других условно-патогенных энтеробактерий (УПЭ), что требует постановки дополнительных идентификационных тестов.

Для идентификации клебсиелл в отечественных микробиологических лабораториях используют агар Эндо, на котором клебсиеллы, как и все бактерии группы кишечной палочки, вырастают одинаковыми колониями красного цвета, что значительно затрудняет выделение микробов в чистом виде и также требует постановки дополнительных идентификационных тестов.

Для специфического выявления клебсиелл используется дифференциально-элективная питательная среда производства ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора (Московская область, пос. Оболенск). Среда ингибирует рост грамположительных микроорганизмов и большинства представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Специфичность среды обеспечивают селективная добавка инозит и кислотно-основной индикатор. Клебсиеллы, утилизирующие инозит, формируют круглые, гладкие, слизистые колонии малинового цвета, в то время как бактерии рода *Escherichia* – бесцветные колонии. Наряду с клебсиеллами на среде возможен рост бактерий рода *Serratia*, которые бывает трудно отличить от клебсиелл при множественном росте колоний,

несмотря на то, что для сераций характерны колонии меньшего размера. В таких случаях необходимы дополнительные идентификационные тесты.

В то же время надо отметить, что в России разработаны ХПС для выявления бактерий рода *Klebsiella*. В Санкт-Петербурге на опытно-промышленном производстве ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора выпускается коммерческий набор питательной среды «Клебсиелла 5-АСК 20», предназначенный для одноэтапного выделения и одновременной идентификации бактерий рода *Klebsiella*. Идентификация бактерий основана на выявлении родоспецифического фермента клебсиелл – 5-аминосалицилатдекарбоксилазы (5-АСК), который продуцируют только бактерии рода *Klebsiella*. 5-АСК расщепляет хромогенный субстрат (5-аминосалициловую кислоту) с образованием парааминофенола. Последний под действием кислорода воздуха образует полимер темно-коричневого цвета, в результате чего исключительно колонии клебсиелл и среда вокруг них окрашиваются в коричневый цвет. Эта среда, предназначенная для научных исследований, состоит из набора реагентов, рассчитанного на приготовление 20 чашек [11]. К недостаткам этой среды можно отнести трудоемкость приготовления и небольшой срок годности.

В филиале АО «НПО Микроген» НПО «Питательные среды» г. Махачкалы разработана ХПС ДагХром Клебсиелла агар (КХА), сухая, которая также основана на выявлении 5-АСК. Определение физико-химических и биологических показателей качества среды КХА проводили согласно Методическим указаниям по контролю бактериологических питательных сред (МУК 4.2 2316-08) [12]. Специфичность КХА была продемонстрирована на примере 5 референс-штаммов рода *Klebsiella* (*K. pneumoniae* 3534/51, *K. oxytoca* 3530/50, *K. mobilis* (*Enterobacter aerogenes*) 418, *K. rhinoscleromatis* ATCC 13884, *K. ozaenae* ATCC 11298) и 4 бактерий других родов (*Citrobacter freundii* 101/57, *Serratia marcescens* CCM 303, *Escherichia coli* Su 3912/41 O55 K:59, *Enterobacter cloacae* 10005). Среда позволяет за 24 ч инкубации посевов одноэтапно выделить и идентифицировать род *Klebsiella*. Предлагаемая среда стандартизована, получена в сухом виде, что представляет значительные удобства при использовании ее в сравнении со средами лабораторного приготовления [13].

Целью настоящей работы явилась оценка эффективности применения ДагХром Клебсиелла агара для одноэтапного выделения и идентификации бактерий рода *Klebsiella* с целью определения перспектив ее использования в практической бактериологии.

Материалы и методы

Исследовано 20 бактериальных культур, выделенных в ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница №2 Департамента здравоохранения г. Москвы» при посеве клинического материала (мазки из носоглотки) от 20 пациентов с ВИЧ-инфекцией на ХПС Uriselect 4 (BioRad, США). Все эти культуры через 24 ч инкубации формировали на данной среде колонии от темно-голубого до голубого цвета, что свидетельствовало о возможной принадлежности к родам *Klebsiella*,

Enterobacter, *Serratia*, *Citrobacter* (триб KESC). Принадлежность колоний к конкретному роду и виду определяли с помощью тест-системы micro-lachema-test ENTEROtest 24 согласно инструкции производителя (Erba Lachema, Чехия).

Также для подтверждения видовой принадлежности, культуры, выросшие на Uriselect 4, засеивали на среду Эндо (ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора, Московская обл., п. Оболенск). С целью идентификации клебсиелл до рода и вида выросшие колонии красного цвета, принадлежащие к семейству *Enterobacteriaceae*, исследовали с помощью дополнительных идентификационных тестов: засеивали на среды Гисса с углеводами, среды Олькеницкого, Кларка, Симмонса, мясопептонный агар (ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора, Московская обл., п. Оболенск), осуществляли постановку теста на индол с помощью реактива Ковача (НИЦФ, Санкт-Петербург) и теста на оксидазу с помощью тест-полосок (Erba, Чехия).

Параллельно чистые культуры с Uriselect 4 пересевали на КХА для дальнейшей оценки этой питательной среды. Обнаружение на КХА коричневых колоний с коричневым преципитатом свидетельствовало о принадлежности испытуемой культуры к роду *Klebsiella*. Уточнение видовой принадлежности проводили с помощью разработанного нами алгоритма.

Результаты исследования и их обсуждение

20 культур, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница №2 Департамента здравоохранения г. Москвы» и изначально отнесенных с помощью коммерческой среды Uriselect 4 к трибу KESC, были исследованы с помощью комплекса тестов с целью их дальнейшей идентификации до конкретного рода и вида (табл. 1).

По тесту подвижности к роду *Klebsiella* отнесено 16 культур (отсутствие подвижности). Среди культур рода *Klebsiella* идентифицировано 15 культур *K. pneumoniae* и одна культура *K. oxytoca*. Культура X1 не была отнесена к роду *Klebsiella*, так как не соответствовала по биохимическим тестам данному роду.

На среде Эндо все культуры выросли красного или ярко-розового цвета.

Те же 20 культур исследовали при посеве на среду КХА. Через 24 ч инкубации на среде КХА 17 выросших культур отнесли к роду *Klebsiella* по наличию коричневых колоний с коричневым преципитатом; 3 культуры, образовавшие зеленые колонии с желтым ореолом, не относились к данному роду (рис. 1, 2).

Для более детальной дифференциации выросших на КХА колоний предложен ранее разработанный алгоритм для идентификации до вида клинически-значимых условно-патогенных микроорганизмов (УПМ): *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. mobilis* (*E. aerogenes*), *K. ozaenae*, *K. rhinoscleromatis*, *E. coli*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis*, *P. aeruginosa* [14]. Указанный алгоритм представлен в табл. 2. Культуры УПМ, выделенные на КХА, идентифицируют до вида с помощью дополнительных 9 тестов. Для этого производят посев культур в полужидкий агар (для

Таблица 1. Идентификация культур, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов
Table 1. Identification of cultures isolated from HIV-infected patients

№	Предполагаемая культура / <i>Proposed culture</i>	Питательные среды (цвет, диаметр и гемолиз вокруг колоний) / <i>Culture media (color, diameter and hemolysis around colonies)</i>			Тесты / Tests												
		UriSelect 4	Эндо	Кровяной агар / <i>Blood agar</i>	Тест на подвижность / <i>Motility test</i>	Образование индола / <i>Formation of indole</i>	Газообразование при расщеплении глюкозы / <i>Gas formation during the breakdown of glucose</i>	Утилизация цитрата / <i>Citrate disposal</i>	Утилизация малоната / <i>Disposal of malonate</i>	Утилизация сорбита / <i>Disposal of sorbitol</i>	Утилизация рамнозы / <i>Utilization of rhamnose</i>	Образование кислоты при ферментации лактозы / <i>Acid formation during lactose fermentation</i>	Образование кислоты при ферментации глюкозы / <i>Formation of acid during fermentation of glucose</i>	Реакция с метиловым красным / <i>Reaction with methyl red</i>	Продукция уреазы / <i>Urease production</i>	Образование H ₂ S / <i>H₂S formation</i>	
1-15	<i>K. pneumoniae</i>	Т-г	Я-р	d 3 мм, β-гемолиз	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
16	<i>K. oxytoca</i>	Т-г	К	d 3 мм, γ-гемолиз	-	+	+	+, -	+	+	+	+	+	+	+, -	+	-
17	Культура Х1	Т-г	Я-р	d 4 мм, γ-гемолиз	-	+	+	+, -	+	+	+	-	+	-	+	-	-
18	Культура Х2	Г	Я-р	d 3 мм, γ-гемолиз	+	-	+	+, -	-	+	-	-	+	-, +	-	-	-
19	Культура Х3	Г	Я-р	d 3 мм, β-гемолиз	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-, +	-	-	-
20	Культура Х4	Г	Я-р	d 3 мм, β-гемолиз	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-, +	-	-	-
Референс-штамм / <i>Reference strain</i>																	
1	<i>E. coli</i> 3912/41	Р	К	d 3 мм, γ-гемолиз	+, -	+	+	-	-	+	(+)	+	+	+	-	-	-
2	<i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603	Т-г	К	d 3 мм, γ-гемолиз	-	-, +	+	+	+	+	+	+	+	-, +	+	-	-
3	<i>K. oxytoca</i> 3530/50	Т-г	К	d 3 мм, γ-гемолиз	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	(+)	-	-
4	<i>K. mobilis</i> (<i>E. aerogenes</i> 418)	Г	К	d 3 мм, γ-гемолиз	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+, -	-	-	-
5	<i>S. marcescens</i> CCM 303	Г	Р	d 1,5 мм, γ-гемолиз	+	-	-, +	+	-	+	-	-	+	-, +	-	-	-
6	<i>E. cloacae</i> 10005	Т-г	К	d 3 мм, γ-гемолиз	+	-	+, -	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Т-г – темно-голубого цвета; Г – голубого цвета; К – красного цвета; Р – розового цвета; Я-р – ярко-розового цвета; «+» – положительная реакция в течение всего срока наблюдения; «-» – отрицательная реакция в течение всего срока наблюдения; «(+)-» – замедленная положительная реакция (после 24 ч); «+, -» – больше положительная реакция, чем отрицательная; «-, +» – больше отрицательная реакция, чем положительная.

T-g – dark blue; G – light blue; K – red; P – pink; Я-р – bright pink; «+» – positive reaction throughout the entire observation period; «-» – negative reaction throughout the entire observation period; «(+)-» – delayed positive reaction (after 24 hours); «+, -» – more positive reaction than negative; «-, +» – more negative reaction than positive.

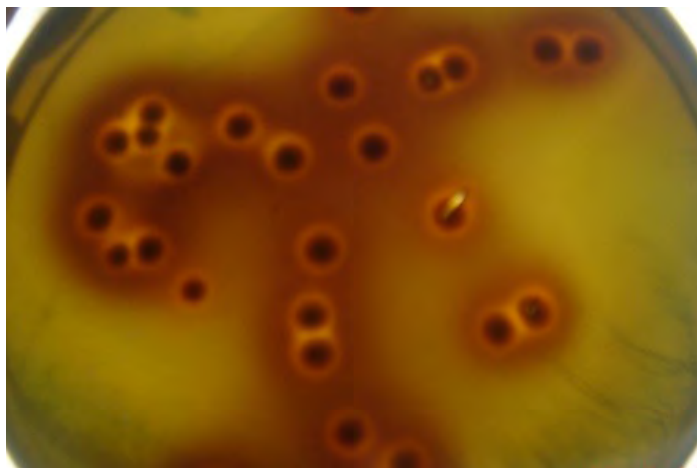


Рис. 1. Рост бактерий рода *Klebsiella* на среде КХА.
Fig. 1. Growth of *Klebsiella* bacteria on KCA medium.

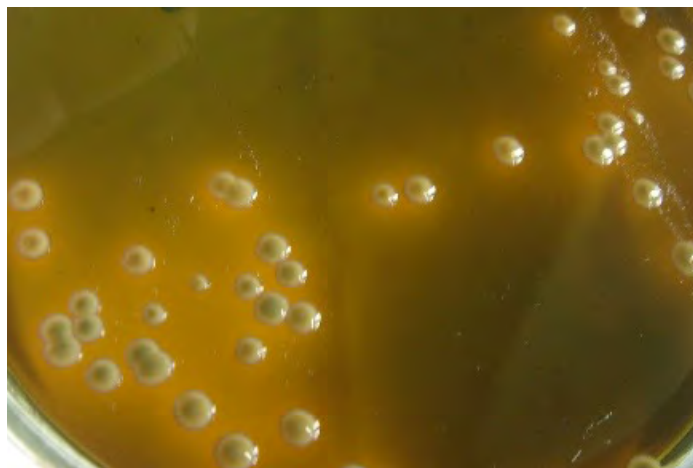


Рис. 2. Рост бактерий, не относящихся к роду *Klebsiella*, на среде КХА.
Fig. 2. Growth of non-*Klebsiella* bacteria on KCA medium.

Таблица 2. Алгоритм использования КХА и биохимических тестов для идентификации клебсиелл и других клинически значимых условно-патогенных микроорганизмов
Table 2. *DagChrome Klebsiella agar (KCA) and biochemical tests usage algorithm for the identification of Klebsiella spp. and other clinically significant opportunistic microorganisms*

№	Условно-патогенные микроорганизмы / Opportunistic pathogens	КХА (цвет и наличие преципитата вокруг колоний) / KCA (color and presence of precipitate around colonies)	Тест на подвижность / Наличие пигмента (цвет) / Motility test/Presence of pigment (color)	Образование индола / Formation of indole	Образование индола / Formation of indole	Газообразование при расщеплении глюкозы / Gas formation during the breakdown of glucose	Утилизация цитрата / Citrate disposal	Образование кислоты при ферментации лактозы / Acid formation during lactose fermentation	Образование кислоты при ферментации глюкозы / Formation of acid during fermentation of glucose	Образование H ₂ S / H ₂ S formation	Наличие цитохромоксидазы / Presence of cytochrome oxidase
1	<i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603	К, с коричневым преципитатом / with brown precipitate	-/-	-,+	+	+	+	+	+	-	-
2	<i>K. oxytoca</i> 3530/50	К, с коричневым преципитатом / with brown precipitate	-/-	+	+, -	+	+	+	+	-	-
3	<i>K. mobilis</i> (<i>E. aerogenes</i> 418)	К, с коричневым преципитатом / with brown precipitate	+/-	-	-	+	+	+	+	-	-
4	<i>K. ozaenae</i> ATCC 11298	К, с коричневым преципитатом / with brown precipitate	-/-	-	-	+	V	V	+	-	-
5	<i>K. rhinoscleromatis</i> ATCC 13884	К, с коричневым преципитатом / with brown precipitate	-/-	-	-	+	-	-	+	-	-
6	<i>E. coli</i> 3912/41	З, с желтым ореолом / with a yellow halo	+/-	+, -	-	+, -	-	+, -	+	-	-
7	<i>E. cloacae</i> 10005	З, с желтым ореолом / with a yellow halo	+/-	-	V	+	+	+	+	-	-
8	<i>C. freundii</i> ATCC 10053	З, с желтым ореолом / with a yellow halo	+/-	-	V	+	+	+	+	+	-
9	<i>S. marcescens</i> CCM 303	З, с желтым ореолом / with a yellow halo	+(K), -	-	-, +	+, -	+	-	+	-	-
10	<i>P. mirabilis</i> 3177	З, с желтым ореолом / with a yellow halo	+/-	-	+	+	+	-	+	+	-
11	<i>P. vulgaris</i> Hx19 222	З, с желтым ореолом / with a yellow halo	+/-	+	+	+	+	-	+	+	-
12	<i>E. faecalis</i> 775	З, с желтым ореолом / with a yellow halo	+/-	-	+	+	+	+	+	-	-
13	<i>P. aeruginosa</i> 68	З, с желтым ореолом / with a yellow halo	+/ (C-3), -	-	+	-	-	-	+	-	+

К – коричневый; З – зеленый; «+» положительная реакция через 18–24 ч у 90% штаммов или более; «-» – отрицательная реакция в течение всего срока наблюдения у 90% штаммов или более; «V» – вариабельная реакция; «+, -» – чаще положительная, реже отрицательная реакция у 90% штаммов или более; «K» – чаще отрицательная, реже положительная реакция у 90% штаммов или более; «V» – вариабельная реакция; «+, -» – more often positive, less often negative reaction in 90% of strains or more; «-, +» – more often negative, less often positive reaction in 90% of strains or more.

постановки теста на подвижность и наличие пигмента), на среду Олькеницкого (для определения уреазы, образования кислоты при ферментации лактозы и глюкозы, газообразования при расщеплении глюкозы и образования H₂S) и цитратный агар Симмонса (для выявления утилизации цитрата), а также исследуют в тесте на образование индола (для проведения теста полоску фильтровальной бумаги кладут в отдельную чашку Петри и пропитывают реактивом Ковача. Стерильным аппликатором отбирают изолированные колонии ночной культуры с агаровой среды. Растирают инокулят на фильтровальной бумаге и наблюдают за изменением цвета. При положительном результате с реактивом

Ковача на бумаге в течение 30 с появляется яркое красное-розовое окрашивание, при отрицательной реакции бумага остается бесцветной). Наличие цитохромоксидазы (оксидазный тест) выявляли путем растирания микробной колонии по диагностической зоне соответствующей тест-полоски: оксидазоположительные бактерии в течение 30 с окрашивали тест-полоску в зоне нанесения образца от голубого до серо-синего, отсутствие изменения цвета или развитие окраски через ≥60 с расценивали как отрицательную реакцию (табл. 2).

С помощью анализа результатов посевов на КХА и результатов приведенных выше тестов проводили дальней-

Таблица 3. Видовая идентификация культур, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов, с помощью разработанного алгоритма использования КХА и биохимических тестов
Table 3. Species identification of cultures isolated from HIV-infected patients by means of KCA and biochemical tests usage algorithm

№	Идентифицированная культура / Identified culture	КХА (цвет и наличие преципитата вокруг колоний) / KCA (color and presence of precipitate around colonies)	Тест на подвижность / Наличие пигмента (цвет) Motility test/Presence of pigment (color)	Образование индола / Formation of indole	Продукция уреазы / Urease production	Газообразование при расщеплении глюкозы / Gas formation during the breakdown of glucose	Утилизация цитрата / Citrate disposal	Образование кислоты при ферментации лактозы / Acid formation during lactose fermentation	Образование кислоты при ферментации глюкозы / Formation of acid during fermentation of glucose	Образование H ₂ S / H ₂ S formation	Наличие цитохромоксидазы / Presence of cytochrome oxidase
1-15	<i>K. pneumoniae</i>	К, с коричневым преципитатом / with brown precipitate	-/-	-	+	-	+	+	+	-	-
16	<i>K. oxytoca</i>	К, с коричневым преципитатом / with brown precipitate	-/-	+	+	+	+, -	+	+	-	-
17	<i>K. oxytoca</i> (X1)	К, с коричневым преципитатом / with brown precipitate	-/-	+	+	+	+, -	-	+	-	-
18	<i>S. marcescens</i> (X2)	З, с желтым ореолом / with a yellow halo	+/-	-	+	+	+, -	-	+	-	-
19	<i>S. marcescens</i> (X3)	З, с желтым ореолом / with a yellow halo	+/-	-	+	+	+	-	+	-	-
20	<i>S. marcescens</i> (X4)	З, с желтым ореолом / with a yellow halo	+/-	-	+	+	+	-	+	-	-

К – коричневые; З – зеленые; «+» – положительная реакция через 18–24 ч; «-» – отрицательная реакция в течение всего срока наблюдения; «+, -» – больше положительная реакция, чем отрицательная.
K – brown; Z – green; «+» – positive reaction after 18–24 hours; «-» – negative reaction during the entire observation period; «+, -» – more positive reaction than negative.

шую видовую идентификацию 20 культур, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов (табл. 3).

При анализе посевов на КХА установлено, что 17 культур принадлежали к роду *Klebsiella* (определено по наличию колоний коричневого цвета с коричневым преципитатом) и 3 культуры (X2, X3, X4) не принадлежали к данному роду, так как формировали колонии другого цвета (зеленые с желтым ореолом).

Идентификация до вида 17 культур рода *Klebsiella* с помощью предложенного комплекса тестов позволила отнести 15 культур к виду *K. pneumoniae* и 2 культуры – к *K. oxytoca*, в т.ч. культуру X1. Исследование 3 культур (X2, X3, X4) зеленого цвета с желтым ореолом позволило идентифицировать их как *S. marcescens*.

В совокупности, включая посев на КХА и постановку биохимических тестов, на исследование потребовалось 48 ч, таким образом, экономия во времени очевидна. Более того, при использовании среды КХА и разработанного алгоритма достаточно было использовать только 9 дополнительных тестов. В то же время надо отметить, что благодаря обнаружению родоспецифического фермента, которым обладают 100% клебсиелл, при обнаружении коричневых колоний с коричневым преципитатом количество тестов можно уменьшить до трех в том случае, если стоит задача идентификация до вида только клебсиелл (достаточно тестов на подвижность, образование индола и продукцию уреазы).

Для сравнения, для родовой и видовой идентификации бактерий, выросших на среде UriSelect 4, использовано 12 дополнительных тестов, продолжительность исследования – от 3 до 5 суток. При этом, как указывалось выше, часто

УПЭ, обладающие схожими биохимическими свойствами, не соответствовали на 100% тому или иному виду по биохимическим признакам.

Ранее нами были проведены сравнительные испытания КХА и среды Эндо на примере клинического материала. Объектом исследований служили 624 образца мочи, 190 образцов мазков от больных, страдающих неспецифическими воспалительными заболеваниями гениталий, 138 образцов мазков от больных с ЛОР-заболеваниями и 150 образцов мокроты (всего 1102 образца). Идентификацию культур, выросших на среде КХА, проводили с использованием разработанного алгоритма, культуры со среды Эндо исследовали в соответствии с действовавшим в то время Приказом Министерства здравоохранения СССР №535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» [15]. На обеих средах были получены сопоставимые результаты по выделению 545 культур УПЭ. При этом только на КХА одновременно с выделением 125 (22,9%) культур были идентифицированы как бактерии рода *Klebsiella*. Результаты видовой идентификации также совпали и показали наличие 125 изолятов *K. pneumoniae*, 382 – *E. coli*, 4 – *E. cloacae*, 3 – *S. marcescens*, 3 – *C. freundii* и 28 – *P. mirabilis*. Для проведения видовой идентификации культур при использовании КХА потребовалось 48 ч, при использовании среды Эндо – от 3 до 5 суток [14].

Характеристика дифференцирующих свойств питательных сред UriSelect 4, Эндо и КХА при идентификации ряда бактерий семейства *Enterobacteriaceae* представлена в табл. 4.

Таблица 4. Специфичность питательных сред при выделении бактерий рода *Klebsiella* через 24 ч инкубации посевов при $t = 37,1^{\circ}\text{C}$ (на примере референс-штаммов)
Table 4. Specificity of nutrient media while isolating *Klebsiella* genus after 24 hours of incubation of crops at $t = 37.1^{\circ}\text{C}$ (using reference-strains as an example)

№	Референс-штаммы / Reference strains	Рост референс-штаммов на питательных средах / Growth of reference strains on nutrient media		
		UriSelect 4	Эндо	КХА
1	<i>E. coli</i> 3912/41	розовые колонии / pink colonies	красные колонии с металлическим блеском или без него / red colonies with or without metallic sheen	зеленые колонии с желтым ореолом / green colonies with a yellow halo
2	<i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603	темно-голубые или голубые колонии / dark blue or blue colonies	красные колонии с металлическим блеском или без него / red colonies with or without metallic sheen	коричневые колонии с коричневым преципитатом / brown colonies with brown precipitate
3	<i>K. oxytoca</i> 3530/50	темно-голубые или голубые колонии / dark blue or blue colonies	красные колонии с металлическим блеском или без него / red colonies with or without metallic sheen	коричневые колонии с коричневым преципитатом / brown colonies with brown precipitate
4	<i>K. mobilis</i> (<i>E. aerogenes</i> 418)	темно-голубые или голубые колонии / dark blue or blue colonies	красные колонии с металлическим блеском или без него / red colonies with or without metallic sheen	коричневые колонии с коричневым преципитатом / brown colonies with brown precipitate
5	<i>K. ozaenae</i> ATCC 11298	темно-голубые или голубые колонии / dark blue or blue colonies	красные колонии с металлическим блеском или без него / red colonies with or without metallic sheen	коричневые колонии с коричневым преципитатом / brown colonies with brown precipitate
6	<i>K. rhinoscleromatis</i> ATCC 13884	темно-голубые или голубые колонии / dark blue or blue colonies	красные колонии с металлическим блеском или без него / red colonies with or without metallic sheen	коричневые колонии с коричневым преципитатом / brown colonies with brown precipitate
7	<i>E. cloacae</i> 10005	темно-голубые или голубые колонии / dark blue or blue colonies	красные колонии с металлическим блеском или без него / red colonies with or without metallic sheen	зеленые колонии с желтым ореолом / green colonies with a yellow halo
8	<i>C. freundii</i> ATCC 10053	темно-голубые или голубые колонии / dark blue or blue colonies	красные колонии с металлическим блеском или без него / red colonies with or without metallic sheen	зеленые колонии с желтым ореолом / green colonies with a yellow halo
9	<i>S. marcescens</i> CCM 303	темно-голубые или голубые колонии / dark blue or blue colonies	бесцветные или бледно-розовые колонии / colorless or pale pink colonies	зеленые колонии с желтым ореолом / green colonies with a yellow halo

Сравнительное изучение питательных сред показало преимущество среды КХА при идентификации бактерий рода *Klebsiella* в сравнении со средами Uriselect 4 и Эндо.

Заключение

При проведении микробиологических исследований важным условием является быстрота получения результатов, что не вызывает сомнений. Использование хромогенных питательных сред позволяет ускорить процесс выявления и идентификации возбудителя. На российском рынке питательных сред значительно уменьшилось количество зарубежных хромогенных питательных сред в связи с повышением цен, а также проблем с логистикой, а отечественные хромогенные питательные среды для одноэтапного выявления микроорганизмов различных таксономических групп используются пока только для научных исследований и не внедрены в практику здравоохранения. Это приводит к значительному увеличению времени и затрат на установление этиологического агента инфекционного процесса.

На предлагаемой к использованию среде КХА бактерии рода *Клебсиелл* выявляются через 24 ч инкубации. Далее для

внутривидовой идентификации достаточно провести всего 2 теста – на индол и подвижность, на что требуется 18–24 ч. На импортной хромогенной среде UriSelect 4 через 24 ч выявляются бактерии триба KESC, поэтому *Клебсиеллы* необходимо сначала дифференцировать от представителей родов *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* и только потом провести внутривидовую идентификацию. Для этого нужно несколько суток.

Что касается среды Эндо, то на ней одинаково выделяют все БГКП. Для дифференциации *Клебсиелл* также необходимо большое количество идентификационных тестов, на что требуется от 3 до 5 суток.

Таким образом, только на среде КХА можно выявить бактерии рода *Klebsiella* в один этап в течение 24 ч, поскольку среда основана на выявлении родоспецифического фермента *Клебсиелл*, и затем плюс еще 24 ч для проведения внутривидовой идентификации с использованием двух тестов.

Кроме того, с помощью КХА и предложенного нами алгоритма можно идентифицировать и другие клинически значимые микроорганизмы, не относящиеся к роду *Клебсиелл*, в течение 48 ч.

Результаты, полученные при проведении данного исследования, открывают перспективы применения отечествен-

ной среды ДагХром Клебсиелла агар для выявления бактерий рода *Klebsiella*. Сравнительное изучение идентификации клебсиелл на различных питательных средах показало, что применение среды КХА, основанной на выявлении родоспецифичного фермента клебсиелл – 5-аминосалицилатдекарбоксилазы, позволяет значительно ускорить и упростить обнаружение этих микроорганизмов. Предложенный алгоритм идентификации клебсиелл до вида позволит сократить время (получение результата через 48 ч), стоимость микробиологического исследования и упростить работу практических бактериологов. На разработанную питательную среду ДагХром Клебсиелла агар получен патент [13].

Важно отметить, что среду КХА можно использовать в проведении комплексных микробиологических диагностических исследованиях УПМ.

Дальнейшие разработки будут направлены на замещение импортного хромогенного субстрата – 5-аминосалициловой кислоты – на отечественный, что существенно снизит себестоимость среды (примерно на 50%) и позволит создать полностью отечественную разработку.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Бондаренко ВМ, Фиалкина СВ, Агапова ОВ. Клебсиеллы и клебсиеллезы. Тверь: Триада, 2008.
2. Николаева ИВ, Семенова ДР, Шайхиева ГС. Современные представления о клебсиеллезной инфекции у детей. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2023;68(5):22-29. DOI: 10.21508/1027-4065-2023-68-5-22-29
3. Чеботарь ИВ, Бочарова ЮА, Подопригора ИВ, Шагин ДА. Почему *Klebsiella pneumoniae* становится лидирующим оппортунистическим патогеном. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2020;22(1):4-19. DOI: 10.36488/cmasc.2020.1.4-19
4. Cubero M, Grau I, Tubau F, Pallarés R, Domínguez MÁ, Liñares J, et al. Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Bloodstream Infections in Adults. Microb Drug Resist. 2018 Sep;24(7):949-957. DOI: 10.1089/mdr.2017.0107
5. Кузьменко СА, Брежнева НИ, Гончаров АЕ, Тутельян АВ. Характеристика свойств внутрибольничной популяции *Klebsiella pneumoniae*. Фундаментальная и клиническая медицина. 2019;4(2):58-65. DOI: 10.23946/2500-0764-2019-4-2-58-65
6. Смирнова МВ, Артемук СД, Белькова ЕИ, Мельцер АА, Козлова НС, Тимирбаева ОЮ, и др. Антибиотикорезистентность штаммов энтеробактерий, выделенных из крови. Медицина: теория и практика. 2019;4(3):91-98.
7. Комисарова ЕВ, Воложанцев НВ. Гипервирulentная *Klebsiella pneumoniae* – новая инфекционная угроза. Инфекционные болезни. 2019;17(3):81-89. DOI: 10.20953/1729-9225-2019-3-81-89

8. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *blaNDM-1*, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Dec;53(12):5046-54. DOI: 10.1128/AAC.00774-09
9. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. Clin Microbiol Rev. 2020 May 13;33(3):e00181-19. DOI: 10.1128/CMR.00181-19
10. Быков АО, Суворова МП, Проценко ДН, Яковлев СВ, Игнатенко ОВ, Бурмистрова ЕН, и др. Анализ структуры бактериемий и чувствительности к антибиотикам микроорганизмов, выделенных в отделениях реанимации и интенсивной терапии в скорпомощном стационаре в период с 2003 по 2021 г.: ретроспективное наблюдательное исследование. Вестник интенсивной терапии им. А.И.Салтанова. 2023;2:55-65. DOI: 10.21320/1818-474X-2023-2-55-65
11. Сиволодский ЕП. Хромогенная синтетическая среда «Клебсиелла 5-АСК хром-С» для выделения и идентификации клебсиелл. Клиническая лабораторная диагностика. 2015;60(5):48-51.
12. МУК 4.2.2316-08. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания. Введ. 2008-01-18. М.: Федеральный центр гигиены и эпиднадзора Роспотребнадзора, 2008.
13. Патент №2416635 С2 Российская Федерация, МПК C12N 1/20, C12Q 1/04, C12R 1/22. Хромогенная питательная среда для выявления и идентификации клебсиелл: № 2008140829/10: заявл. 14.10.2008: опубл. 20.04.2011. Меджидов ММ, Степанова ЭД, Юнусова РЮ; заявитель Научно-производственное предприятие «Питательные среды».
14. Меджидов ММ, Степанова ЭД, Юнусова РЮ, Горелова ВГ, Омарова СМ. Оценка диагностической эффективности алгоритма выделения и ускоренной идентификации УПЗ с использованием отечественных хромогенных питательных сред. Клиническая лабораторная диагностика. 2012;5:51-54.
15. Приказ МЗ СССР № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений». М.: Медицина, 1985.

References

1. Bondarenko VM, Fialkina SV, Agapova OV. Klebsiella and klebsiellaezy. Tver: Triada, 2008. (In Russian).
2. Nikolaeva IV, Semenova DR, Shaikhieva GS. Current insight into klebsiella infection in children. Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics. 2023;68(5):22-29. DOI: 10.21508/1027-4065-2023-68-5-22-29 (In Russian).
3. Chebotar IV, Bocharova YuA, Podoprighora IV, Shagin DA. The reasons why *Klebsiella pneumoniae* becomes a leading opportunistic pathogen. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2020;22(1):4-19. DOI: 10.36488/cmasc.2020.1.4-19 (In Russian).
4. Cubero M, Grau I, Tubau F, Pallarés R, Domínguez MÁ, Liñares J, et al. Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Bloodstream Infections in Adults. Microb Drug Resist. 2018 Sep;24(7):949-957. DOI: 10.1089/mdr.2017.0107
5. Kuz'menko SA, Brezhneva NI, Goncharov AE, Tutel'yan A.V. Features of nosocomial *Klebsiella pneumoniae* population. Fundamental and Clinical Medicine. 2019;4(2):58-65. DOI: 10.23946/2500-0764-2019-4-2-58-65 (In Russian).
6. Smirnova MV, Artemuk SD, Belkova EI, Melzer AA, Kozlova NS, Kugotova DA, et al. Antibiotic resistance of enterobacteria strains isolated from blood. Medicine: Theory and Practice. 2019;4(3):91-98. (In Russian).
7. Komisarova EV, Volozhantsev NV. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: a new infectious threat. Infekc. bolezni (Infectious Diseases). 2019;17(3):81-89. DOI: 10.20953/1729-9225-2019-3-81-89 (In Russian).

8. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrobial agents and Chemotherapy. 2009;53(12):5046-5054. DOI: 10.1128/aac.00774-09
9. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. Clin Microbiol Rev. 2020 May 13;33(3):e00181-19. DOI: 10.1128/CMR.00181-19
10. Bykov AO, Suvorova MP, Protsenko DN, Yakovlev SV, Ignatenko OV, Burmistrova EN, et al. Analysis of the structure of bacteremia and sensitivity to antibiotics of microorganisms isolated in intensive care units in an emergency hospital in the period from 2003 to 2021: a retrospective observational study. Annals of Critical Care. 2023;2:55-65. DOI: 10.21320/1818-474X-2023-2-55-65 (In Russian).
11. Sivolodsky EP. The chromogenic synthetic medium "Klebsiella 5-ASK CHROM-C" for isolation and identification of klebsiellae. Klin Lab Diagn. 2015 May;60(5):48-51. (In Russian).
12. MUK 4.2.2316-08 Methods of control. Biological and microbiological factors. Methods of control of bacteriological nutrient media. Methodical instructions. Introduction. 2008-01-18. M.: Federal Center for Hygiene and Surveillance of Rospotrebnadzor, 2008. (In Russian).
13. Medjidov MM, Stepanova ED, Yunusova RYu. Chromogennaya pitatel'naya sreda dlya vivyazheniya i identifikatsii klebsiell. Patent № 2416635 data registr. 20.04.2011. (In Russian).
14. Medjidov MM, Stepanova ED, Yunusova RYu, Gorelova VG, Omarova SM. The evaluation of diagnostic effectiveness of algorithm of isolation and express identification of opportunistic enterobacteria using national chromogenic growth mediums. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. 2012;(5):51-54. (In Russian).
15. Decree of the Ministry of Health of the USSR No 535 "On the unification of microbiological (bacteriological) research methods used in clinical diagnostic laboratories of medical institutions." M.: Medicine, 1985. (In Russian).

Информация о соавторах:

Горелова Виктория Геннадьевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической физиологии Дагестанского государственного медицинского университета

Воропаева Елена Александровна, доктор биологических наук, доцент, руководитель отдела медицинской биотехнологии, главный научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора

Лиханская Елена Ивановна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией микробиологии и профилактики кишечных инфекций Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора

Скирда Татьяна Александровна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории коковых инфекций Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора

Бичучер Анна Мироновна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории коковых инфекций Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора

Мартыненко Ирина Геннадиевна, научный сотрудник лаборатории коковых инфекций Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора

Полилова Ирина Алексеевна, врач микробиологической лаборатории Инфекционной клинической больницы №2 Департамента здравоохранения г. Москвы

Мещерякова Анна Викторовна, врач микробиологической лаборатории Инфекционной клинической больницы №2 Департамента здравоохранения г. Москвы

Глухова Марина Ивановна, кандидат экономических наук, доцент кафедры менеджмента и маркетинга Московского психолого-социального университета

Комбарова Светлана Юрьевна, доктор биологических наук, директор Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Victoria G. Gorelova, PhD, MD, Associate Professor, Department of Pathological Physiology, Dagestan State Medical University

Elena A. Voropaeva, PhD, DSc (Biological Sciences), Associate Professor, Head of the Department of Medical Biotechnology, Chief Researcher, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology, G.N.Gabrichesky Research Institute for Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor

Elena I. Likhanskaya, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher at the Laboratory of Microbiology and Prevention of Intestinal Infections, G.N.Gabrichesky Research Institute for Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor

Tatiana A. Skirda, PhD, MD, Leading Researcher at the Laboratory of Coccal Infections, G.N.Gabrichesky Research Institute for Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor

Anna M. Bichucher, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher at the Laboratory of Coccal Infections, G.N.Gabrichesky Research Institute for Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor

Irina G. Martynenko, Researcher at the Laboratory of Coccal Infections, G.N.Gabrichesky Research Institute for Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor

Irina A. Polilova, microbiological laboratory doctor, Infectious Clinical Hospital No 2 of the Moscow Department of Health

Anna V. Meshcheryakova, microbiological laboratory doctor, Infectious Clinical Hospital No 2 of the Moscow Department of Health

Marina I. Glukhova, PhD in Economic Sciences, Associate Professor, Department of Management and Marketing, Moscow Psychological and Social University

Svetlana Yu. Kombarova, PhD, DSc (Biological Sciences), Director of G.N.Gabrichesky Research Institute for Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor

Внутривидовая вариабельность вирулентных свойств *Burkholderia thailandensis*

А.Ю.Замарина, М.В.Бартенева, И.А.Хабарова, С.И.Жукова, Н.Г.Плеханова, А.Д.Викторов, И.Б.Захарова

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора,
Волгоград, Российская Федерация

Burkholderia thailandensis – сапрофитическая бактерия, филогенетически близкая *Burkholderia pseudomallei*, до недавнего времени считавшаяся непатогенной. Описанные случаи инфекции, вызванные *B. thailandensis*, в т.ч. системные с летальным исходом, редки и все первоначально были диагностированы как мелиоидоз. Однако вопрос о вирулентных свойствах *B. thailandensis* до сих пор остается неясным.

Цель. Оценить вирулентность разных штаммов *B. thailandensis*, диссеминацию по органам и тканям в процессе инфекции и динамику изменения вирулентности при пассировании *in vivo*.

Материалы и методы. Инфекцию моделировали на белых мышах (беспородных линии Balb/c) и золотистых хомячках. Животных заражали внутрибрюшинно в дозах 10^4 , 10^6 , 10^8 м.к. по 10 особей на дозу заражения. Значения LD_{50} рассчитывали для 30-дневного периода. Исследовано 15 штаммов *B. thailandensis*. Наличие возбудителя оценивали бактериологически и методом полимеразной цепной реакции.

Результаты. Показано наличие внутривидовой вариабельности вирулентных свойств *B. thailandensis* – 28,6% исследованных штаммов проявляли вирулентность для золотистых хомячков. Обнаружено, что после пассирования *in vivo* вирулентность *B. thailandensis* повышается – LD_{50} статистически достоверно снижалась на 1–3 порядка ($p < 0,05$). После долгосрочного хранения в искусственных условиях вирулентность снижается. Наименьшую способность к диссеминации показал штамм E264, тогда как штаммы VS22501 и VS22512 обнаруживались во всех исследованных органах к 25-м суткам, бактериального клиренса не наблюдали ни в одном случае.

Заключение. По способности к диссеминации по различным органам в процессе инфекции без выраженного тканевого тропизма, повышению вирулентности после пассирования *in vivo* и ее снижению после долгосрочного хранения в искусственных условиях *B. thailandensis* сходна с возбудителем мелиоидоза. В отличие от *B. pseudomallei*, штаммы *B. thailandensis* дикого типа вызывают не острую, а хроническую форму инфекции при сходной патоморфологической картине.

Ключевые слова: *Burkholderia thailandensis*, вирулентность, *Burkholderia pseudomallei*, диссеминация

Для цитирования: Замарина А.Ю., Бартенева М.В., Хабарова И.А., Жукова С.И., Плеханова Н.Г., Викторов А.Д., Захарова И.Б. Внутривидовая вариабельность вирулентных свойств *Burkholderia thailandensis*. Бактериология. 2025; 10(3): 71–76. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-71-76

Intraspecific variability of virulence properties *Burkholderia thailandensis*

A.Yu.Zamarina, M.V.Barteneva, I.A.Khabarova, S.I.Zhukova, N.G.Plekhanova, A.D.Victorov, I.B.Zakharova

Volgograd Research Institute for Plague Control of Rospotrebnadzor, Volgograd, Russian Federation

Burkholderia thailandensis is a saprophytic bacterium phylogenically close to *Burkholderia pseudomallei*, which was recently considered nonpathogenic. The described cases of infection caused by *B. thailandensis*, including systemic, are rare and all were initially diagnosed as melioidosis. However, the question of the virulent properties of *B. thailandensis* remains unclear.

The goal. To evaluate the virulence of different *B. thailandensis* strains, dissemination through organs and tissues during infection, and the dynamics of virulence changes during *in vivo* passaging.

Materials and methods. The infection was modeled on white mice (outbred and Balb/c line) and golden hamsters. Animals were infected intraperitoneally in doses of 10^4 , 10^6 , 10^8 m.c., 10 animals per each dose of infection. LD_{50} values were calculated for a 30-day period. Fifteen strains of *B. thailandensis* were studied. The presence of the pathogen was assessed bacteriologically and by the method PCR.

Results. The presence of intraspecific variability of virulence properties was shown – 28.6% of the studied strains exhibited virulence for golden hamsters. It was found that virulence of *B. thailandensis* increased after *in vivo* passing – LD_{50} statistically reliably decreased by 1–3 order ($p < 0,05$). After long-term storage, the virulence decreases. Strain E264 showed the lowest ability to disseminate, while VS22501 and VS22512 were found in all the studied organs, by the 25th day bacterial clearance was not observed in any case.

Для корреспонденции:

Замарина Анастасия Юрьевна, научный сотрудник лаборатории патогенных буркхольдерий ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 400066, Волгоград, ул. Голубинская, 7
Телефон: (8442) 37-37-74

Статья поступила 24.03.2025, принята к печати 30.09.2025

For correspondence:

Anastasia Yu. Zamarina, Researcher at the Laboratory of Pathogenic Burkholderia, Volgograd Research Institute for Plague Control of Rospotrebnadzor

Address: 7 Golubinskaya str., Volgograd, 400066, Russian Federation
Phone: (8442) 37-37-74

The article was received 24.03.2025, accepted for publication 30.09.2025

Conclusion. *B. thailandensis* is similar to *B. pseudomallei* on its ability to disseminate to various organs during infection without pronounced tissue tropism, increase in virulence after *in vivo* passaging, and its decrease after long-term storage in artificial conditions. Unlike *B. pseudomallei*, wild-type *B. thailandensis* strains cause not an acute but a chronic form of infection with a pathomorphological similar to melioidosis.

Key words: *Burkholderia thailandensis*, virulence, *Burkholderia pseudomallei*, dissemination

For citation: Zamarina A.Yu., Barteneva M.V., Khabarova I.A., Zhukova S.I., Plekhanova N.G., Victorov A.D., Zakharova I.B. Intraspecific variability of virulence properties *Burkholderia thailandensis*. Bacteriology. 2025; 10(3): 71–76. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-71-76

Комплекс *Burkholderia pseudomallei* (BPC) в настоящее время содержит 8 видов: *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. humptydooensis*, *B. oklahomensis*, *B. singularis*, *B. mayonis* и *B. savannae* [1]. Среди представителей BPC два высокопатогенных вида – *B. pseudomallei* и *B. mallei* – занимают особое положение, являясь возбудителями особо опасных инфекций мелиоидоза и сапа соответственно. Все виды BPC, за исключением возбудителя сапа, являются сапрофитами. Наиболее филогенетически близким видом для возбудителей мелиоидоза и сапа является *B. thailandensis*, имеющая высокое генетическое сходство с *B. pseudomallei* и занимающая с ней одинаковые экологические ниши [2]. *B. thailandensis* впервые была выделена из почвы на северо-востоке Таиланда и до получения в 1998 г. видового статуса считалась слабовирулентным биотипом *B. pseudomallei*. Сравнительный анализ кодирующих последовательностей основного генома видов *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* показал, что из 4447 кодирующих последовательностей (CDS), входящих в схему типирования, 4266 являются общими для этих видов и только 181 CDS уникальна для *B. thailandensis* [2]. Морфология колоний *B. thailandensis* на твердых питательных средах, особенно на агаре Эшдауна, практически не отличима от колоний *B. pseudomallei*. Биохимически *B. thailandensis* отличается от *B. pseudomallei* только способностью утилизировать арабинозу, и автоматизированные биохимические анализаторы в большинстве случаев идентифицируют *B. thailandensis* как *B. pseudomallei*, а доступные коммерческие системы MALDI-TOF MS (Bruker Microflex Biotyper и bioMérieux Vitek MS) часто определяют *B. pseudomallei* как *B. thailandensis* [3]. Сравнительный анализ профилей липополисахарида, являющегося одним из основных иммуногенов, показал их полную идентичность у *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* [4]. У вариантов по структуре капсулы штаммов *B. thailandensis*, обозначенных BTCV (*B. thailandensis* capsular variant), оперон, кодирующий биосинтез капсульного полисахарида, который также относится к основным иммуногенным антигенам, на 95% гомологичен с кластером генов CPS *B. pseudomallei* [5]. BTCV-штаммы перекрестно реагируют с моноклональными антителами на эпитопы капсульного полисахарида *B. pseudomallei*, что приводит к ошибкам в идентификации возбудителя. В связи с этим видовая идентификация *B. thailandensis* и ее дифференциация с *B. pseudomallei* представляет определенную проблему.

Так же как и возбудитель мелиоидоза, *B. thailandensis* является факультативным внутриклеточным патогеном, который обладает сходным с *B. pseudomallei* набором факторов вирулентности [6]. В организме теплокровных хозяев *B. thailandensis* демонстрирует ряд свойств, характерных для возбудителя мелиоидоза: устойчивость к фиксации комплек-

мента, выживаемость в макрофагах и толерантность к активным формам кислорода. Оба вида используют сходные молекулярные механизмы для выживания в фагоцитирующих клетках хозяина и используют общую стратегию межклеточного распространения, индуцируя образование многоядерных гигантских клеток [7]. В связи с этим *B. thailandensis* активно используется в качестве модели для изучения механизмов вирулентности *B. pseudomallei*.

В течение довольно длительного времени *B. thailandensis* не считалась патогенной для человека. Поскольку в научной литературе описаны случаи инфекции различной степени тяжести, в т.ч. системные с летальным исходом (сепсис, поражение центральной нервной системы), этот тезис в настоящее время подвергается обоснованному сомнению [3, 8–10]. Необходимо отметить, что описанные в литературе случаи первоначально были диагностированы как мелиоидоз. Этиологический агент *B. thailandensis* установлен только после верификации в крупных исследовательских центрах, с использованием в т.ч. полногеномного секвенирования, и весьма вероятно, что большинство случаев инфицирования *B. thailandensis* остаются недиагностированными или проходят под диагнозом мелиоидоза.

До сих пор остается неясным вопрос о длительности персистенции *B. thailandensis* в организме теплокровных, а также о динамике изменения патогенных свойств в процессе инфекции. Известно, что у возбудителя мелиоидоза при пассировании через организм восприимчивых животных вирулентность возрастает, тогда как подобные данные относительно *B. thailandensis* в доступной литературе не обнаружены, и прояснение вопроса о динамике вирулентности штаммов *B. thailandensis* при пассировании *in vivo* и определение оптимального уровня биологической безопасности при работе с данным микроорганизмом является важной задачей Референс-центра по мониторингу за возбудителями мелиоидоза и сапа. В этой связи исследования, направленные на установление патогенного потенциала *B. thailandensis*, представляют определенный практический интерес.

Цель исследования: оценить вирулентность разных штаммов *B. thailandensis*, диссеминацию по органам и тканям в процессе инфекции и динамику изменения вирулентности при пассировании *in vivo*.

Материалы и методы

Инфекцию моделировали на лабораторных животных – относительно устойчивых беспородных и линии Balb/c белых мышах (в возрасте 6–8 нед., массой 18–22 г) и высокочувствительных к мелиоидозу золотистых хомячков (в возрасте 8–10 нед., массой 80–100 г). Животных заражали внутрибрюшинно в дозах 104, 106, 108 м.к., по 10 особей на дозу

заражения. Значения LD₅₀ рассчитывали для 30-дневного периода по И.П.Ашмарину [11].

Исследовано 15 штаммов *B. thailandensis*, в т.ч. 1 штамм BTCV 2.1 из коллекции ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора и референтный штамм вида *B. thailandensis* E264 (любезно предоставлен в коллекцию института профессором D.E.Woods (University of Calgary) в 1998 г.).

Наличие возбудителя оценивали бактериологически и методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием набора реагентов для выявления и дифференциации *B. mallei*, *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* «Амплиген-Буркхольдерии группы pseudomallei» βLB/D-Eph (PY P3H 2018/7785) [12]. ДНК выделяли с помощью набора для выделения геномной ДНК из клеток, тканей и крови (ООО «Биолабмикс», Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Продукты ПЦР анализировали в 1,5%-м агарозном геле и визуализировали с помощью окрашивания бромидом этидия.

Все исследования проводились в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Все манипуляции с животными проводили в соответствии с законодательством России и международными этическими нормами. Протокол исследования согласован с комиссией по биоэтике ФКУЗ ВНИПЧИ (протокол №4 от 10.10.2023).

Результаты исследования и их обсуждение

Вирулентность штаммов оценивали по LD₅₀ для золотистых хомячков, нелинейных белых мышей и мышей линии BALB/c.

При экспериментальной инфекции золотистых хомячков диапазон уровня вирулентности протестированных изолятов находился между LD₅₀ 10⁴ м.к. и >10⁸ м.к. Штаммы *B. thailandensis* сиквенс-типа ST80 (E264, VS22510, VS22514 и VS22515; ST345 VS22401 и VS22402; ST76 VS22407, VS22508 и VS22509; ST77 VS22513, а также BTCV 2.1 (ST696)) гибели хомячков при всех дозах заражения не вызывали, что позволяет отнести их к авирулентным. Для штаммов VS22406 (ST76), VS22501 и VS22511 (ST80), VS22512 (ST77) LD₅₀ варьировала от 10⁴ до 10⁶ м.к. (рис. 1), что сопоставимо с таковой для мышей BALB/c отдельных клинических штаммов *B. pseudomallei* с относительно низким уровнем вирулентности (LD₅₀ 5·10⁴–10⁶ м.к.) [13]. Полученные данные показали, что у *B. thailandensis* так же, как и у *B. pseudomallei*, корреляция между сиквенс-типом и уровнем вирулентности не прослеживается. Отсутствие гибели животных при экспериментальной инфекции, обусловленной BTCV 2.1, показало, что наличие у штамма *B. thailandensis* *B. pseudomallei*-подобной капсулы не является решающим фактором вирулентности. В пользу данного вывода также свидетельствуют описание двух случаев летальной инфекции в Китае и местной инфекции в Лаосе. Этиологическим агентом системных инфекций были штаммы *B. thailandensis* 2022DZh и *B. thailandensis* BPM, относящиеся к основной филогенетической кладе. Оба штамма принадлежат к ST76, выделены с интервалом ~10 лет и географически разделены расстоянием ~200 км [8, 9]. В случае

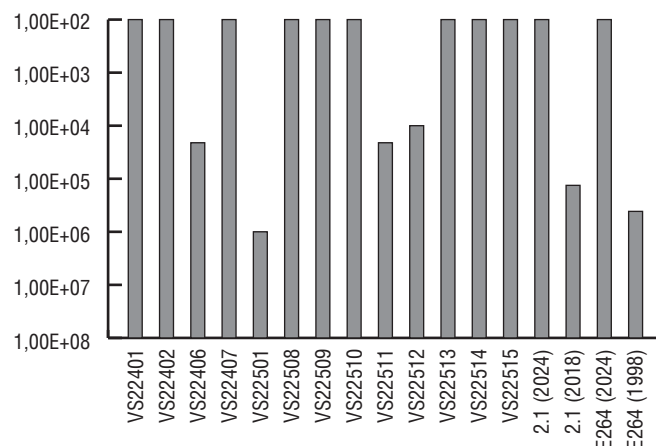


Рис. 1. Вирулентность штаммов *B. thailandensis* для золотистых хомячков.

Fig. 1. Virulence of *B. thailandensis* strains in golden hamsters.

успешно вылеченного пациента из Лаоса причиной инфекции был штамм BTCV LPD1900722 (ST696) [10].

У павших от инфекции *B. thailandensis* хомячков обнаружены проявления, сходные с подострым мелиоидозом: множественные абсцессы печени, легких, и селезенки. В некоторых случаях за несколько дней до гибели у животных наблюдали парезы задних лап и неконтролируемую дрожь – симптомы, характерные для мелиоидоза.

Все исследованные штаммы *B. thailandensis* не вызывали гибели нелинейных белых мышей после введения максимальной дозы – 10⁸ м.к. Для мышей линии BALB/c LD₅₀ определяли с использованием 4 отличающихся по вирулентности для золотистых хомячков штаммов *B. thailandensis*. Моделирование инфекции *B. thailandensis* на мышах линии BALB/c показало межштаммовые отличия вирулентности для этой биомодели. При заражении штаммами *B. thailandensis* VS22512 и VS22501 LD₅₀ варьировала от 10⁵ до 10⁸ м.к. Штаммы *B. thailandensis* E264 и 2.1, у которых ранее LD₅₀ для золотистых хомячков составляла 2,6·10⁴ м.к. (1998 г.) и 7,3·10⁴ м.к. (2018 г.), после длительного хранения гибели линейных мышей, как и золотистых хомячков, не вызывали (рис. 1, табл. 1).

Необходимо отметить, что белые мыши разных линий значительно отличаются по восприимчивости к *B. pseudomallei*. Так, по данным J.M.Warawa, между линиями BALB/c и C57BL/6 существует более чем 200-кратная разница по восприимчивости к мелиоидозу, причем линия C57BL/6 и нелинейные мыши имеют одинаковый уровень восприимчивости

Таблица 1. Вирулентность штаммов *B. thailandensis* для белых мышей

Table 1. Virulence of *B. thailandensis* strains for white mice

Штамм / Strain	ST	LD ₅₀ (м.к.) / (m.c.)	
		Нелинейные мыши / Outbred mice	BALB/c
<i>B. thailandensis</i> E264	ST80	>10 ⁸	>10 ⁸
<i>B. thailandensis</i> 2.1	ST696	>10 ⁸	>10 ⁸
<i>B. thailandensis</i> VS22501	ST80	>10 ⁸	2,1·10 ⁸
<i>B. thailandensis</i> VS22512	ST77	>10 ⁸	2,1·10 ⁵

Таблица 2. Динамика вирулентности *B. thailandensis* для золотистых хомячков при пассаже *in vivo*
Table 2. Dynamics of *B. thailandensis* virulence in golden hamsters during *in vivo* passage

Штамм / Strain <i>B. thailandensis</i>	LD ₅₀ (м.к.) / (m.c.)		Средняя продолжительность жизни (суток)* / Average lifetime (days)*	
	Исходные / Original	Пассированные / After the passages	Исходные / Original	Пассированные / After the passages
VS22406	4,6·10 ⁴	4,6·10 ³	16	7,6
VS22501	10 ⁴	2,1·10 ³	14	5,8
VS22511	4,6·10 ⁴	4,6·10 ³	23	10,4
VS22512	10 ⁶	2,1·10 ³	16	7,2

*Внутрибрюшинное заражение в дозе 10⁶ м.к. / Intraperitoneal infection at a dose of 10⁶ m.c.

[14]. Полученные нами данные позволяют сделать аналогичное заключение о восприимчивости нелинейных мышей и линии BALB/c к *B. thailandensis*.

Таким образом, показано, что около трети исследованных штаммов (28,6%) проявляли вирулентность для золотистых хомячков и среди штаммов *B. thailandensis* имеется внутри-видовая вариабельность вирулентных свойств.

Для исследования потенциала повышения уровня вирулентности *B. thailandensis* во время инфекции был проведен 2-кратный пассаж *in vivo* с использованием золотистых хомячков. По этическим причинам для пассирования выбрано только 4 вирулентных штамма. Полученные данные по анализу стабильности вирулентности *B. thailandensis* приведены в табл. 2.

У всех исследованных штаммов после пассажей наблюдали повышение уровня вирулентности – LD₅₀ статистически достоверно снижалась ($p < 0,05$) на 1–3 порядка, при сниже-

нии средней продолжительности жизни биомоделей более чем в 2 раза.

Необходимо отметить, что у двух длительно хранившихся штаммов *B. thailandensis* E264 и 2.1 LD₅₀ повысилась с изначальных 2,6·10⁴ м.к. (1998 г.) и 7,3·10⁴ м.к. (2018 г.) до >10⁸ м.к. (2024 г.), т.е. при длительном хранении в искусственных условиях наблюдается снижение вирулентных свойств (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют, что *B. thailandensis* так же, как и возбудитель мелиоидоза, обладает свойством повышения вирулентности после пассирования *in vivo* и ее снижения после долгосрочного хранения в искусственных условиях.

Для изучения диссеминации исходных штаммов по органам и тканям исследовали секционный материал от павших и подвергнутых эвтаназии золотистых хомячков на 7, 16 и 25-е сутки после заражения. Ни один из исследованных штаммов не вызывал острой инфекции, период гибели животных пришелся на 8–16-е сутки. Исследование секционного материала павших и подвергнутых эвтаназии животных на наличие ДНК *B. thailandensis* методом ПЦР показало положительные результаты для всех биопроб, причем ДНК возбудителя обнаружена в трех и более внутренних органах с дальнейшим подтверждением бактериологическим методом (рис. 2, табл. 3).

По способности к диссеминации *B. thailandensis* по внутренним органам выявлены межштаммовые отличия, как и по срокам распространения инфекции. К концу первой недели наблюдения все исследованные штаммы обнаружены в селезенке, печени и легких, за исключением референтного штамма *B. thailandensis* E264, который выявлен только в брыжеечном лимфатическом узле. Пик диссеминации для всех штаммов пришелся на 8–16-е сутки, причем все штаммы, за исключением E264, к этому времени колонизировали и внутренние репродуктивные органы. У выживших к 25-м суткам животных бактериального клиренса не наблюдали ни в одном случае. Более того, штаммы VS22501 и VS22512 обнаружены и в головном мозге.

Заключение

Таким образом, по способности к диссеминации по различным органам в процессе инфекции без выраженного тканевого тропизма, повышению вирулентности после пассирования *in vivo* и ее снижению после долгосрочного хранения в искусственных условиях *B. thailandensis* сходна с возбудителем мелиоидоза. В отличие от *B. pseudomallei*, штаммы *B. thailandensis* дикого типа вызывают не острую, а хро-

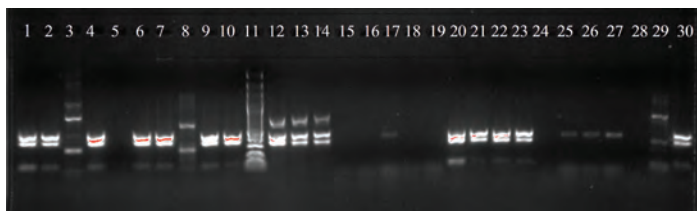


Рис. 2. Исследование секционного материала от животных на наличие ДНК *B. thailandensis* методом ПЦР. Проба (штамм): 1 – л.у.п. (VS 22512), 2 – л.у.б. (264), 3 – печень (VS 22512), 4 – л.у.п. (VS 22512), 5 – головной мозг (VS 22512), 6 – л.у.б. (VS 22512), 7 – селезенка (VS 22512), 8 – л.у.п. (264), 9 – селезенка (264), 10 – л.у.п. (VS 22501), 11 – маркер, 12–14 – К+, 15 – К-, 16 – тимус (VS 22501), 17 – головной мозг (VS 22501), 18 – матка (VS 22501), 19 – печень (264), 20 – селезенка (VS 22501), 21 – печень (VS 22501), 22 – легкое (VS 22501), 23 – тимус (VS 22501), 24 – печень (VS 22501), 25 – семенник (VS 22501), 26 – л.у.б. (VS 22501), 27 – тимус (VS 22501), 28 – семенник (VS 264), 29 – головной мозг (VS 2.1), 30 – селезенка (2.1). Сокращения: л.у.п. – лимфатический узел паховый, л.у.б. – лимфатический узел брыжеечный, К- – отрицательный контроль, К+ – положительный контроль (ДНК *B. pseudomallei*).

Fig. 2. Study of autopsy material from animals for the presence of *B. thailandensis* DNA by the PCR method. Sample (strain): 1 – i.l.n. (VS 22512), 2 – m.l.n. (264), 3 – liver (VS 22512), 4 – i.l.n. (VS 22512), 5 – brain (VS 22512), 6 – m.l.n. (VS 22512), 7 – spleen (VS 22512), 8 – i.l.n. (264), 9 – spleen (264), 10 – i.l.n. (VS 22501), 11 – marker, 12–14 – K+, 15 – K-, 16 – thymus (VS 22501), 17 – brain (VS 22501), 18 – uterus (VS 22501), 19 – liver (264), 20 – spleen (VS 22501), 21 – liver (VS 22501), 22 – lung (VS 22501), 23 – thymus (VS 22501), 24 – liver (VS 22501), 25 – testicle (VS 22501), 26 – i.l.n. (VS 22501), 27 – thymus (VS 22501), 28 – testicle (VS 264), 29 – brain (VS 2.1), 30 – spleen (2.1). Abbreviations: i.l.n. – inguinal lymph node, m.l.n. – mesenteric lymph node, K- – negative control, K+ – positive control (*B. pseudomallei* DNA).

Таблица 3. Диссеминация исходных штаммов *B. thailandensis* у золотистых хомячков
Table 3. Dissemination of *B. thailandensis* parent strains in golden hamsters

Штамм / Strain	Легкие / Lungs	Печень / Liver	Селезенка / Spleen	Тимус / Thymus	Лимфоузел брыжеечный / Mesenteric lymph node	Головной мозг / Brain	Лимфоузел паховый / Inguinal lymph node	Половые органы (матка/семенники) / Genitals (uterus/testes)
7-е сутки								
<i>B.thailandensis</i> 2.1	+	+	+	+				
<i>B.thailandensis</i> E264					+			
<i>B.thailandensis</i> VS22501	+	+	+		+			
<i>B.thailandensis</i> VS22512	+	+	+	+	+		+	+
8–16-е сутки								
<i>B.thailandensis</i> 2.1			+		+		+	+
<i>B.thailandensis</i> E264		+	+		+			
<i>B.thailandensis</i> VS22501	+	+	+		+	+	+	+
<i>B.thailandensis</i> VS22512	+	+	+	+	+		+	+
17–25-е сутки								
<i>B.thailandensis</i> 2.1			+	+	+			+
<i>B.thailandensis</i> E264					+			+
<i>B.thailandensis</i> VS22501	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B.thailandensis</i> VS22512	+	+	+	+		+	+	
Серым выделены результаты исследования павших животных. / Results of the study of dead animals are highlighted in grey.								

ническую форму инфекции при сходной патоморфологической картине. Полученные данные свидетельствуют о наличии у *B. thailandensis* внутривидовой вариабельности вирулентных свойств, не коррелирующих с принадлежностью штаммов к определенному сиквенс-типу. Также показано, что наличие в геноме Vp-like CPS кластера генов биосинтеза капсульного полисахарида для штаммов *B. thailandensis* не является решающим фактором вирулентности и для выявления факторов, определяющих межштаммовые отличия в уровне вирулентности, необходимы исследования на молекулярно-генетическом уровне, что является предметом наших дальнейших исследований.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Информация о финансировании

Авторы заявляют об отсутствии дополнительной финансовой поддержки для данного исследования.

Financial support

The authors declare no additional financial support for this study.

Литература / References

- Hall CM, Baker AL, Sahl JW, Mayo M, Scholz HC, Kaestli M, et al. Expanding the *Burkholderia pseudomallei* Complex with the Addition of Two Novel Species: *Burkholderia mayonis* sp. nov. and *Burkholderia savannae* sp. nov. Appl Environ Microbiol. 2022 Jan 11;88(1):e0158321. DOI: 10.1128/AEM.01583-21
- Meumann EM, Limmathurotsakul D, Dunachie SJ, Wiersinga WJ, Currie BJ. *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis. Nat Rev Microbiol. 2024 Mar;22(3):155-169. DOI: 10.1038/s41579-023-00972-5
- Gee JE, Elrod MG, Gulvik CA, Haselow DT, Waters C, Liu L, et al. *Burkholderia thailandensis* isolated from infected wound, Arkansas, USA. Emerging Infectious Diseases, 2018;24(11):2091. DOI: 10.3201/eid2411.180821
- Hsueh PT, Liu CL, Wang HH, Ni WF, Chen YL, Liu JK. A comparison of the immunological potency of *Burkholderia* lipopolysaccharides in endotoxemic BALB/c mice. Microbiol Immunol. 2016 Nov;60(11):725-739. DOI: 10.1111/1348-0421.12450
- Sim BMQ, Chantratita N, Ooi WF, Nandi T, Tewhey R, Wuthiekanun V, et al. Genomic acquisition of a capsular polysaccharide virulence cluster by non-pathogenic *Burkholderia* isolates. Genome biology. 2010;11:1-17. DOI: 10.1186/gb-2010-11-8-r89
- Kovacs-Simon A, Hemsley CM, Scott AE, Prior JL, Titball RW. *Burkholderia thailandensis* strain E555 is a surrogate for the investigation of *Burkholderia pseudomallei* replication and survival in macrophages. BMC microbiology. 2019;19:1-16. DOI: 10.1186/s12866-019-1469-8.
- Place DE, Briard B, Samir P, Karki R, Bhattacharya A, Guy CS, et al. Interferon inducible GBPs restrict *Burkholderia thailandensis* motility induced cell-cell fusion. PLoS pathogens, 2020;16(3):e1008364. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008364.
- Chang K, Luo J, Xu H, Li M, Zhang F, Li J, et al. Human Infection with *Burkholderia thailandensis*, China, 2013. Emerg Infect Dis. 2017 Aug;23(8):1416-1418. DOI: 10.3201/eid2308.170048
- Li J, Tan J, Xiong X, Zhong Q, Lu W. *Burkholderia thailandensis* Isolated from Infected Wound, Southwest China, 2022. Emerg Infect Dis. 2024 May;30(5):1055-1057. DOI: 10.3201/eid3005.230743
- Vannachone S, Luangraj M, Dance D, Chantratita N, Saiprom N, Seng R, et al. Case Report: Soft tissue infection with *Burkholderia thailandensis* capsular variant: case report from the Lao PDR. Wellcome Open Res. 2024 Nov 28;9:421. DOI: 10.12688/wellcomeopenres.22706.1
- Ашмарин ИП, Воробьев АА. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Медицинская литература, 1962. / Ashmarin IP, Vorob'ev AA. Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh. Meditsinskaya literatura, 1962. (In Russian).
- Zakharova I, Teteryatnikova N, Toporkov A, Viktorov D. Development of a multiplex

- PCR assay for the detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia thailandensis*, and *Burkholderia cepacia* complex. *Acta Trop.* 2017 Oct;174:1-8. DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.06.016
13. Ulett GC, Currie BJ, Clair TW, Mayo M, Ketheesan N, Labrooy J, et al. *Burkholderia pseudomallei* virulence: definition, stability and association with clonality. *Microbes Infect.* 2001 Jul;3(8):621-31. DOI: 10.1016/s1286-4579(01)01417-4
14. Warawa JM. Evaluation of surrogate animal models of melioidosis. *Front Microbiol.* 2010 Dec 29;1:141. DOI: 10.3389/fmicb.201.00141

Информация о соавторах:

Бартенева Мария Васильевна, научный сотрудник лаборатории патогенных буркхольдрий ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Хабарова Ирина Андреевна, научный сотрудник лаборатории экспериментальных биомоделей ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Жукова Светлана Ивановна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальных биомоделей ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Плекханова Наталья Геннадьевна, кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальных биомоделей ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Викторов Андрей Дмитриевич, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальных биомоделей ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Захарова Ирина Борисовна, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории патогенных буркхольдрий ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Maria V. Barteneva, Researcher at the Laboratory of Pathogenic *Burkholderia*, Volgograd Research Institute for Plague Control of Rosпотребнадзора

Irina A. Khabarova, Researcher at the Laboratory of Experimental Biomodels, Volgograd Research Institute for Plague Control of Rosпотребнадзора

Svetlana I. Zhukova, PhD, MD, Associate Professor, Senior Researcher at the Laboratory of Experimental Biomodels, Volgograd Research Institute for Plague Control of Rosпотребнадзора

Natalia G. Plekhanova, PhD in Biological Sciences, Associate Professor, Senior Researcher at the Laboratory of Experimental Biomodels, Volgograd Research Institute for Plague Control of Rosпотребнадзора

Andrey D. Victorov, Junior Researcher at the Laboratory of Experimental Biomodels, Volgograd Research Institute for Plague Control of Rosпотребнадзора

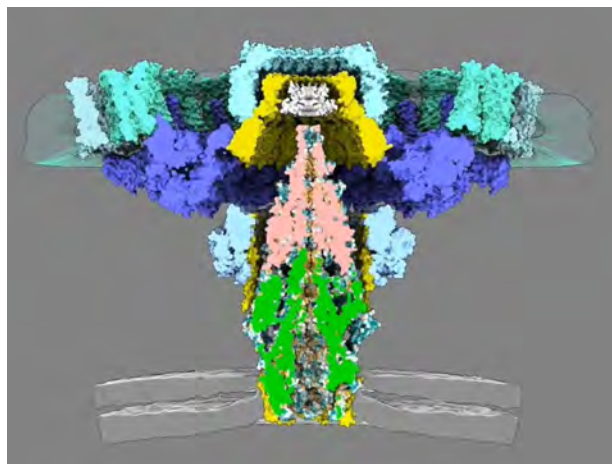
Irina B. Zakharova, PhD, DSc (Biological Sciences), Associate Professor, Leading Researcher at the Laboratory of Pathogenic *Burkholderia*, Volgograd Research Institute for Plague Control of Rosпотребнадзора

НОВОСТИ НАУКИ

Ученые Йельского университета зафиксировали болезнь легионеров «на месте преступления»

Legionella pneumophila использует систему секреции Dot/Icm IV типа для транслокации эффекторных белков через бактериальную оболочку в клетки-хозяева, что в конечном итоге приводит к тяжелой болезни легионеров. В данной работе определены *in situ* почти атомную структуру системы Dot/Icm в интактных бактериях. Идентифицированы два важных, но ранее загадочных белка, DotA и IcmX, которые образуют центральный протоканал внутри системы Dot/Icm в неактивном состоянии, предотвращая преждевременную секрецию эффекторов до установления тесного контакта с клеткой-хозяином. После активации система Dot/Icm претерпевает радикальную конформационную перестройку, формируя протяженный открытый трансоболочечный канал, способный осуществлять прямую транслокацию эффекторных белков из бактериальной цитоплазмы в клетки-хозяева.

Система секреции Dot/Icm *Legionella pneumophila* относится к числу наиболее универсальных систем секреции IV типа (T4SS), способных транслоцировать более 330 различных эффекторных белков через бактериальную оболочку в клетки-хозяева. Для сборки и функционирования этой системы требуется не менее 27 белков Dot и Icm, однако ее архитектура и механизм активации остаются недостаточно изученными на молекулярном уровне. В данной работе использовали *in situ* одночастичную криоэлектронную микроскопию для определения околоатомных структур системы Dot/Icm и ее тесной связи с тремя различными поринами наружной мембраны интактных бактерий. Примечательно, что два важных, но загадочных компонента, DotA и IcmX, образуют пентамерный протоканал в неактивном состоянии на центральной оси системы Dot/Icm. При активации Dot/Icm лизатом хозяина этот протоканал претерпевает обширные перестройки, формируя протяженный трансконduit, что визуализируется с помощью криоэлектронной томографии (крио-ЭТ) и усреднения субтомограмм. Более того, сочетание крио-ЭТ и крио-ФИБ измельчения макрофагов, инфицированных *L. pneumophila*, выявляет прикрепление Dot/Icm-машины к мембране хозяина, что предполагает прямую транслокацию эффекторных белков из бактериальной цитоплазмы в хозяина. В совокупности эти исследования идентифицируют комплекс DotA–IcmX как посредника для транслокации эффектора и предоставляют молекулярную основу для понимания сборки и активации сложной Dot/Icm T4SS.



Yue J, Heydari S, Park D, Chetrit D, Tachiyama S, Guo W, et al.

In situ structures of the *Legionella* Dot/Icm T4SS identify the DotA-IcmX complex as the gatekeeper for effector translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2025 Sep 30;122(39):e2516300122. DOI: 10.1073/pnas.2516300122

Многоуровневая взаимосвязь микробиома кишечника с коморбидным фоном у женщин в период менопаузы

Н.В.Богачева, М.Л.Смертина, Е.Е.Корнеева

ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Киров, Российская Федерация

Нарушение гормонального фона у женщин в период менопаузы является причиной высокого уровня коморбидности. В обзорной статье рассмотрено влияние гормонального фона на различные процессы, происходящие в организме женщин в условиях дефицита эстрогенов. Эстрогены модулируют серотонинергический и адренергический тонус, влияя на физическое, эмоциональное, психическое состояние женщины в климактерическом периоде. В условиях дефицита эстрогенов использование с профилактической целью бифидобактерий позволяет решить проблему депрессивного или тревожного состояния женщины. Эстрогены способствуют сохранению массы мышц. Снижение тонуса мышц в постменопаузальном периоде на фоне гормонального дисбаланса приводит к нарушению эвакуаторной функции кишечника, дисбиозу и развитию хронических заболеваний кишечника. Последнее, в свою очередь, способствует снижению количества *Faecalibacterium* spp. в кишечном содержимом и вызывает в период менопаузы развитие патологических процессов, связанных с дефицитом синтеза масляной кислоты. Недостаток этой кислоты приводит к нарушению гомеостаза в кишечном микробиоме и поддержанию коморбидного фона у женщины в менопаузальный период. Параллельно со снижением уровня *Faecalibacterium* spp. увеличивается количество *Blautia* spp. Повышение уровня *Blautia* spp. может коррелировать с уменьшением симптомов тревоги и депрессии. Научные исследования подтверждают влияние дисбактериоза кишечника на количественный и качественный состав микрофлоры урогенитального тракта. облигатные анаэробы – *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* и др., обитающие в основном в желудочно-кишечном тракте, – рассматриваются как главные патогены и участники ко-инфицирования, вызывающие инфекционно-воспалительные процессы в репродуктивных органах женщин. Качественный и количественный состав микробиоты кишечника напрямую связан метаболическим синдромом, развитием ожирения и диабета второго типа.

В качественном и количественном составе нормофлоры кишечника у женщин в постменопаузе также наблюдаются изменения в виде снижения разнообразия и уменьшения количества *Lactobacillus* и представителей рода *Bifidobacterium*, что способствует риску развития воспалительных процессов в кишечнике, а также различным проявлениям метаболического синдрома.

Ключевые слова: микробиом кишечника, коморбидность, менопауза, дефицит эстрогенов, дисбиоз кишечника, метаболический синдром, депрессивное расстройство

Для цитирования: Богачева Н.В., Смертина М.Л., Корнеева Е.Е. Многоуровневая взаимосвязь микробиома кишечника с коморбидным фоном у женщин в период менопаузы. Бактериология. 2025; 10(3): 77–82. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-77-82

Multilevel relationship between gut microbiome and comorbid background in menopausal women

N.V.Bogacheva, M.L.Smertina, E.E.Korneeva

Kirov State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Kirov, Russia

Hormonal disruption in menopausal women is responsible for high levels of comorbidity. The review article examines the influence of hormonal background on various processes occurring in the body of women in conditions of estrogen deficiency. Estrogens modulate serotonergic and adrenergic tone, affecting the physical, emotional, mental state of a woman in the climacteric period. In conditions of estrogen deficiency, the use of bifidobacteria for preventive purposes can solve the problem of a woman's depressive or anxious state. Estrogens help preserve muscle mass. A decrease in muscle tone in the postmenopausal period against the background of hormonal imbalance leads to a violation of the evacuation function of the intestine, which supports the state of dysbiosis and the development of chronic intestinal diseases. The presence of chronic intestinal diseases contributes to a decrease in the amount of *Faecalibacterium* in the intestinal content and causes the development of pathological processes associated with a deficiency in the synthesis of butyric acid during menopause. Lack of malic acid leads to impaired homeostasis in the intestinal microbiome and maintenance of a comorbid background in a woman in the menopausal period. In parallel with the decrease in *Faecalibacterium*, the number of *Blauti* is increasing. Increased levels

Для корреспонденции:

Богачева Наталья Викторовна, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры микробиологии и вирусологии Кировского государственного медицинского университета

Адрес: 610027, Киров, ул. К.Маркса, 112

Статья поступила 12.02.2025, принята к печати 30.09.2025

For correspondence:

Natalia V. Bogacheva, MD, PhD, DSc, Associate Professor, Professor of the Department of Microbiology and Virology, Kirov State Medical University

Address: 112 K.Marks str., Kirov, 610027, Russian Federation

The article was received 12.02.2025, accepted for publication 30.09.2025

of *Blautia* may correlate with decreased symptoms of anxiety and depression. Scientific studies confirm the effect of intestinal dysbiosis on the quantitative and qualitative composition of the urogenital tract microflora. Obligate anaerobes – *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, etc., which live mainly in the gastrointestinal tract, are considered as the main pathogens and participants in co-infection that cause infectious and inflammatory processes in the reproductive organs of women. The qualitative and quantitative composition of the gut microbiota is directly related to the metabolic syndrome, the development of obesity and type 2 diabetes.

In the qualitative and quantitative composition of the intestinal normoflora in postmenopausal women, changes are also observed in the form of a decrease in the diversity and decrease in the number of *Lactobacillus* and representatives of the genus *Bifidobacterium*, which contributes to the risk of developing inflammatory processes in the intestine, as well as various manifestations of metabolic syndrome.

Key words: gut microbiome, comorbidity, menopause, estrogen deficiency, gut dysbiosis, metabolic syndrome, depressive disorder

For citation: Bogacheva N.V., Smertina M.L., Korneeva E.E. Multilevel relationship between gut microbiome and comorbid background in menopausal women. Bacteriology. 2025; 10(3): 77–82. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-77-82

Одной из значимых причин высокого уровня коморбидности у женщин в период менопаузы являются нарушения гормонального фона – снижение уровня эстрогенов и повышение уровня фолликулостимулирующего гормона. Нарушению гормонального фона сопутствует увеличение частоты встречаемости сопутствующих заболеваний. Так, если в возрасте 18–44 лет коморбидные состояния встречаются в 69% случаев, то в возрасте 45–64 лет – в 93%, а у лиц старше 65 лет – в 98%. Среди наиболее часто встречающихся заболеваний следует выделить: артериальную гипертензию (39,9%); избыточную массу тела (36,5%), ожирение I, II, III степени (26,8; 12,4; 6,9% соответственно); нарушение гликемии натощак (6,2%), нарушение толерантности к глюкозе (6,9%); сахарный диабет 2-го типа (19,2%) [1, 2].

В настоящее время остается актуальным вопрос влияния гормонального фона женщины в период менопаузы на микробиом кишечника. Недостаточно изучен качественный и количественный его состав, не раскрыты пути взаимодействия микробиоценоза с гормональным фоном. Все вышесказанное является темой для анализа и систематизации.

По имеющимся результатам исследований состав микробиома и гормоны в организме женщины имеют двустороннюю регуляторную связь. В частности, показана взаимосвязь кишечной микробиоты с гормональным фоном женщины в период менопаузы в зависимости от наличия или отсутствия у нее менопаузального синдрома. Показано, что в группе с менопаузальным синдромом преобладают виды *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Bacteroides ovatus*, *Lactobacillus ruminis*, *Veillonella dispar*, *Eubacterium biforme*, в то время как у женщин без менопаузального синдрома микробиом представлен *Corynebacterium stationis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bacteroides coprophilus*, *Clostridium celatum*, *Ruminococcus albus*, *Helicobacter rodentium*, *Aggregatibacter segnis*, *Acinetobacter guillouiae*. При этом было выявлено, что эстрадиол положительно коррелирует с тремя наиболее часто встречающимися видами бактерий у здоровых женщин в период менопаузы, такими как *A. segnis*, *B. animalis*, *A. guillouiae* ($p < 0,05$), в то время как фолликулостимулирующий и лютеинизирующий гормоны отрицательно коррелируют с ними ($p < 0,05$) [3].

Количество эстрогена, по мнению Dothard et al., не только влияет на качественный и количественный состав микробиома влагалища, но и приводит к уменьшению видового разнообразия кишечного микробиома, потере его полового диморфизма [4].

Существует мнение, что микробиом кишечника влияет на метаболизм эстрогена. Механизм влияния можно представить следующим образом. Эстроген метаболизируется β -глюкуронидазой, выделяемой микроорганизмами. β -глюкуронидаза преобразует эстроген из конъюгированной формы в деконъюгированную. Деконъюгированные и несвязанные (активные и свободные) эстрогены циркулируют в кровотоке и связываются с эстрогенными рецепторами α ($ER\alpha$) и β ($ER\beta$), расположенными во многих тканях организма человека [5].

Одним из вариантов стимуляции эстрогеновых рецепторов является повышение синтеза трансформирующего фактора роста- β , ингибирующего функции остеокластов и снижающего образование лизосомальных ферментов, что в конечном итоге приводит к замедлению резорбции кости. В связи с этим уменьшение уровня эстрогенов приводит к развитию наиболее часто встречающейся в период менопаузы патологии – остеопороза. По данным исследований, в период менопаузы частота переломов значительно выше у женщин с пониженным содержанием *Bacteroidetes*, чем у женщин без остеопороза. Влияние *Bacteroidetes* на развитие остеопороза можно объяснить их участием в синтезе витамина К, который повышает минеральную плотность костной ткани [6–8].

Многочисленные исследования также показали взаимосвязь между составом микробиоты, синтезируемых ей метаболитов, развитием остеопороза и нарушением липидного спектра. У пациенток с постменопаузальным остеопорозом выявлены значительные изменения уровня содержания таких метаболитов, как леволиновая кислота, N-ацетилнейраминная кислота и соответствующие им сигнальные пути, в частности метаболизм α -линоленовой кислоты и метаболизм селеносодержащих соединений [9]. В настоящее время рекомендуют определение уровней их содержания в сыворотке крови как предикторов формирования дополнительных стратегий лечения климактерического синдрома и профилактики развития коморбидных состояний [10, 11].

Эстрогены модулируют серотонинергический и адренергический тонус, влияя на физическое, эмоциональное, психическое состояние женщины в климактерическом периоде. Результатом гипозестрогении является развитие ключевых вазомоторных менопаузальных симптомов, приводящих к формированию психоэмоциональных расстройств в виде лабильности настроения; депрессивного состояния; тревожности; раздражительности; повышенной возбудимости;

агрессии; панических атак. Умеренные проявления депрессии выявляются примерно у 50% пациенток, которые обращаются за медицинской помощью вследствие менопаузальных симптомов.

В настоящее время проводится большое количество исследований, раскрывающих многогранность влияния состава микробиоты кишечника на изменение психоэмоционального фона человека. Появился новый класс пробиотиков – психобиотики, многообещающей стала стратегия использования психобиотического лечения для улучшения качества жизни людей, страдающих нейродегенеративными заболеваниями и нарушениями развития [12].

Доказано профилактическое действие бифидобактерий против депрессивного или тревожного поведения. Данные из различных источников свидетельствуют о том, что как у здоровых людей, так и у пациентов с шизофренией, которые принимают пробиотические добавки, содержащие бифидобактерии, отмечается положительный эффект воздействия на данную симптоматику.

Подобные исследования о возможности изменения психоэмоционального фона путем коррекции микробиоты кишечника проводят и в отношении женщин в климактерическом периоде. В группе женщин, испытывающих менопаузальный синдром, с низкой частотой психических симптомов количество бифидобактерий было выше, чем у женщин с гипострогией, имеющих состояние депрессии. Снижение количества таких представителей микробиоты кишечника, как *Firmicutes* и *Roseburia* spp., рассматривают как фактор воздействия на психоэмоциональное состояние женщин в данный период [13].

Эстрогены способствуют сохранению массы мышц благодаря широкой представленности в ней эстрогеновых рецепторов, непосредственно вовлеченных в метаболические процессы и косвенно воздействующих на образование соматотропного гормона, инсулиноподобного фактора роста-1 и провоспалительных цитокинов, а также участвуют в механизмах нейромышечного контроля, что в условиях эстрогенного дефицита наряду с процессами старения может приводить к снижению массы и силы мышц. Снижение тонуса мышц приводит к нарушению эвакуаторной функции кишечника, что поддерживает состояние дисбиоза кишечника в постменопаузальный период. В период постменопаузы увеличивается количество женщин, страдающих хроническими запорами, целиакией, синдромом раздраженного кишечника и воспалительными заболеваниями кишечника (включая болезнь Крона и язвенный колит) и т.д.

Доказано, что наличие хронических заболеваний кишечника приводит к снижению количества *Faecalibacterium* в кишечном содержимом. Представители данного рода известны своей способностью вырабатывать масляную кислоту. Масляная кислота действует на активность ядерного фактора NF-κB (каппа-би), играющего решающую роль в регуляции экспрессии множества генов, ответственных за пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток, а также генов воспалительного и иммунного ответа, выступая перспективным фактором воздействия для профилактики и лечения онкологических процессов. Масляная кислота улучшает чувствительность к инсулину и регулирует метаболизм глюкозы, что делает ее полезной для профилактики и лече-

ния метаболического синдрома и диабета 2-го типа. Она также оказывает нейропротекторное действие, способствуя улучшению когнитивных функций, сниженных в постменопаузальном периоде. Снижение уровня *Faecalibacterium* в период менопаузы приводит к развитию патологических процессов, связанных с дефицитом синтеза масляной кислоты [14]. Кроме того, описаны способности *Faecalibacterium prausnitzii* синтезировать бутиратсалициловую кислоту. Бутират является важным энергетическим источником для колоноцитов и обладает противовоспалительным действием, подавляет активацию NF-κB, что снижает экспрессию провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-6, интерлейкин-8 и фактор некроза опухоли-α, а также способствует дифференцировке регуляторных Т-клеток (Treg), которые играют ключевую роль в поддержании иммунного гомеостаза. Салициловая кислота и другие производные салицилатов также обладают противовоспалительным действием. Снижение уровня *Faecalibacterium* приводит к нарушению гомеостаза в кишечном микробиоме и способствует формированию коморбидного фона в период постменопаузы [15]. В настоящее время *F. prausnitzii* рассматривают как пробиотик нового поколения, прием которого способствует значительному увеличению количества *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Turicibacter* [16].

В постменопаузальный период параллельно со снижением уровня *Faecalibacterium* увеличивается количество *Blautia*. Бактерия участвует в ферментации пищевых волокон с образованием короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), таких как ацетат, пропионат и бутират. Эти соединения играют ключевую роль в регуляции энергетического метаболизма, снижении воспаления и улучшении чувствительности к инсулину. Исследования показывают, что повышенное содержание *Blautia* в микробиоме связано с уменьшением риска ожирения и метаболического синдрома.

За счет продукции бутирата *Blautia* подавляет провоспалительные цитокины, снижает системное воспаление и укрепляет кишечный барьер. Взаимодействуя с иммунными клетками кишечника, бактерия способствует развитию толерантности к комменсальным бактериям и снижению аутоиммунных реакций [17].

Повышение уровня *Blautia* может коррелировать с уменьшением симптомов тревоги и депрессии. За счет конкуренции за ресурсы и продукции антимикробных веществ с патогенными бактериями, такими, например, как *Clostridium difficile*, бактерия способна выступать претендентом для использования в профилактике инфекций. Таким образом, *Blautia* можно также рассматривать в качестве пробиотика с множеством полезных эффектов, включая улучшение метаболического здоровья, снижение воспаления, укрепление кишечного барьера и модуляцию иммунной системы [18].

В исследовании Tap et al. показано влияние специфических изменений кишечной микробиоты на тяжесть течения синдрома раздраженного кишечника, достаточно часто сопровождающего нарушение психоэмоционального фона у женщин в период менопаузы. Отмечена взаимосвязь между интенсивностью абдоминальной боли и низким микробным разнообразием, а также изменением соотношения *Methanobacteriales* и *Bacteroides* в пользу последних при данной патологии [19, 20].

Гипоэстрогения ведет к развитию генитоуринарного менопаузального синдрома (ГУМС). Анкетирование женщин в постменопаузе в возрасте >40 лет для выявления симптомов ГУМС с гинекологическим осмотром для обнаружения объективных признаков или без него показало широкий разброс частоты возникновения сухости влагалища, раздражения, зуда и диспареунии, которая колебалась от 13 до 87%.

Научные исследования подтверждают влияние дисбактериоза кишечника на количественный и качественный состав микрофлоры урогенитального тракта. Увеличение условно-патогенных микроорганизмов до 85% и снижение бифидо- и лактобактерий <70% в кишечнике ассоциированы с повышением содержания условно-патогенных микроорганизмов в вагинальном биоптате у пациенток с инфекционно-воспалительными заболеваниями органов малого таза. Такие облигатные анаэробы, как *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* и прочие, обитающие в основном в желудочно-кишечном тракте, рассматриваются в настоящее время как главные патогены и участники ко-инфицирования, вызывающие инфекционно-воспалительные процессы в репродуктивных органах женщин [21].

Качественный и количественный состав микроиоты кишечника напрямую связан с метаболическим синдромом. Микробиота у мужчин при сравнении с женщинами в постменопаузальный период может отличаться в зависимости от индекса массы тела (ИМТ). Так, Haro et al. отметили, что численность представителей рода *Bacteroides* при ИМТ >33 кг/м² ниже у мужчин, чем у женщин. При дальнейшем увеличении ИМТ количество представителей данного рода бактерий у мужчин уменьшалось, а у женщин оставалось неизменным. В образцах фекалий у мужчин по сравнению с женщинами было более высокое содержание *Veillonella* spp. (84,6% против 47,2%) и *Methanobrevibacter* spp. (84,6% против 47,2%) и более низкое – *Bifidobacterium* spp. По результатам исследования было выявлено, что 66 таксонов бактерий на уровне рода связаны с ИМТ и липидами в плазме крови [22].

Нарушению липидного обмена способствует все та же гипоэстрогения. В постменопаузальный период повышается индекс атерогенности, снижается уровень липопротеинов высокой плотности, повышается синтез липопротеинов низкой плотности и молекул адгезии сосудистых клеток, молекул адгезии воспалительных клеток, что в совокупности ведет к прогрессированию атеросклеротических процессов. Высокая частота сердечно-сосудистых нарушений у женщин в период менопаузы обусловлена формирующимися изменениями в свертывающей системе в сторону повышения прокоагуляционной и снижения антифибринолитической активности, а также нарушением противовоспалительных эффектов.

У женщин в постменопаузе с дислипидемией наблюдается снижение количества полезных бактерий, таких как *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, и увеличение числа потенциально патогенных микроорганизмов, таких как *Bacteroides* и *Proteobacteria*. Использование препаратов, повышающих уровень эстрогенов, может оказывать положительное влияние на кишечные бактерии и липидный обмен [6].

На липидный обмен влияют *Bacteroides* и *Prevotella* – роды бактерий, способные ферментировать непереваренные углеводы и производить КЦЖК, такие как ацетат, про-

пионат и бутират. КЦЖК оказывают значительное влияние на регуляцию энергетического баланса и липидного обмена. Исследование, опубликованное в журнале *Nature Reviews Endocrinology* в 2016 г., показывает, что КЦЖК могут активировать рецепторы GPR41 и GPR43, которые регулируют экспрессию генов, связанных с липидным обменом [23].

Akkermansia muciniphila – вид бактерий, который связан с улучшением чувствительности к инсулину и снижением ожирения за счет модуляции липидного обмена. Из данных, опубликованных Depommier et al., следует, что *A. muciniphila* может уменьшать количество триглицеридов в печени и улучшать профиль липидов в крови [24].

Среди представителей архей на липидный обмен влияет *Methanobrevibacter smithii*. Это метаногенный архей, который взаимодействует с бактериями для утилизации продуктов ферментации, может повышать эффективность энергетической экстракции из пищи. Исследование, опубликованное в журнале *Gut Microbes* в 2018 г., показывает, что увеличение численности *M. smithii* может быть связано с повышенной массой тела и изменениями в липидном обмене [25].

Некоторые виды грибов, такие как *Candida albicans*, могут также оказывать влияние на липидный обмен через воспалительные процессы и изменение иммунного ответа. Грибы могут способствовать развитию системного воспаления, которое, в свою очередь, может нарушать регуляцию липидного обмена.

У женщин с ожирением и дислипидемией в постменопаузе часто наблюдается повышенное соотношение *Firmicutes*/*Bacteroidetes*, что связано с усилением воспаления и риском метаболических нарушений. Повышение соотношения между данными микроорганизмами в кишечном микробиоме у женщин в постменопаузальный период приводит к повышению уровня свободно циркулирующих эстрогенов и увеличению связывания с ERα и ERβ, вызывая такие заболевания, как рак эндометрия, рак молочной железы, эндометриоз и др. Определение количества этих бактерий в фекалиях женщин рассматривают как диагностический и терапевтический маркер лечения и профилактики вышеперечисленных заболеваний [26].

Если говорить о качественном и количественном составе нормофлоры кишечника, то у женщин в постменопаузе наблюдается снижение разнообразия и уменьшается количество *Lactobacillus* и представителей рода *Bifidobacterium* по сравнению с женщинами репродуктивного возраста. Снижение численности *Lactobacillus* spp. может увеличивать риск развития грибковых инфекций, таких как кандидоз. Некоторые виды *Bifidobacterium*, такие как *B. longum* и *B. breve*, могут замещаться другими видами, менее эффективными в поддержании здоровья кишечника. Снижение численности и разнообразия *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* может также способствовать повышению риска развития воспалительных процессов в кишечнике и метаболических заболеваний, таких как ожирение и диабет 2-го типа [27].

Таким образом, вышеописанные патогенетические механизмы объясняют многоуровневую взаимосвязь микробиоты кишечника женщины с гормональным и нарастающим с возрастом коморбидным фоном. Анализ особенностей микробиоты кишечника женщины, определение ее количественных и качественных характеристик могут выступать моделью

оценки благополучия коморбидного фона женщины и предиктором, определяющим направления профилактических и лечебных мероприятий у женщин с отягощенным анамнезом.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках внутривузовского гранта ФГБОУ ВО «Кировский ГМУ» Минздрава России №3-2025-ГРАНТ.

Funding information

The work was carried out within the framework of the intra-university grant of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Kirov State Medical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation No 3-2025-GRANT.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Литература

1. Игнатьева ЕВ, Крюков ЕВ, Чернецов ВА, Рукавицын ОА. Коморбидность у больных лимфопролиферативными заболеваниями. Клиническая медицина. 2020;96(7):508-514. DOI: 10.30629/0023-2149-2020-98-7-508-514
2. Баранова ЕИ, Кацап АА, Колесник ОС, Лебедева ЕВ. Гипертоническая болезнь у женщин в пери- и постменопаузе – патофизиологические механизмы и подходы к лечению. Российский кардиологический журнал. 2023;28(5):5439. DOI: 10.15829/1560-4071-2023-5439
3. Liu Y, Zhou Y, Mao T, Huang Y, Liang J, Zhu M, et al. The relationship between menopausal syndrome and gut microbes. BMC Womens Health. 2022;8;22(1):437. DOI: 10.1186/s12905-022-02029-w
4. Dothard MI, Allard SM, Gilbert JA. The effects of hormone replacement therapy on the microbiomes of postmenopausal women. Climacteric. 2023 Jun;26(3):182-192. DOI: 10.1080/13697137.2023.2173568
5. Якушевская ОВ, Юренева СВ, Протасова АЭ. Метаболизм эстрогенов: почему так важно сохранять равновесие? Гинекология. 2019;21(6):31-35. DOI: 10.26442/20795696.2019.6.190752
6. Xie X, Song J, Wu Y, Li M, Guo W, Li S, et al. Study on gut microbiota and metabolomics in postmenopausal women. BMC Womens Health. 2024;15;24(1):608. DOI: 10.1186/s12905-024-03448-7
7. He J, Xu S, Zhang B, Xiao C, Chen Z, Si F, et al. Gut microbiota and metabolite alterations associated with reduced bone mineral density or bone metabolic indexes in postmenopausal osteoporosis. Aging (Albany NY). 2020 May 11;12(9):8583-8604. DOI: 10.18632/aging.103168
8. Wang Z, Chen K, Wu C, Chen J, Pan H, Liu Y, et al. An emerging role of *Prevotella histicola* on estrogen deficiency-induced bone loss through the gut microbiota-bone axis in postmenopausal women and in ovariectomized mice. Am J Clin Nutr. 2021 Oct 4;114(4):1304-1313. DOI: 10.1093/ajcn/nqab194
9. Ozaki D, Kubota R, Maeno T, Abdelhakim M, Hitosugi N. Association between gut microbiota, bone metabolism, and fracture risk in postmenopausal Japanese women. Osteoporos Int. 2021 Jan;32(1):145-156. DOI: 10.1007/s00198-020-05728-y
10. Kou J, He C, Cui L, Zhang Z, Wang W, Tan L, et al. Discovery of Potential Biomarkers for Postmenopausal Osteoporosis Based on Untargeted GC/LC-MS. Front Endocrinol (Lausanne). 2022 Apr 19;13:849076. DOI: 10.3389/fendo.2022.849076
11. Wang H, Liu J, Wu Z, Zhao Y, Cao M, Shi B, et al. Gut microbiota signatures and fecal metabolites in postmenopausal women with osteoporosis. Gut Pathog. 2023 Jul 6;15(1):33. DOI: 10.1186/s13099-023-00553-0
12. Дбар СД, Стоянова ЛГ. Новое поколение пробиотиков – психобиотики, их назначение и функции. Антибиотики и химиотерапия. 2021;66(9-10):64-78. DOI: 10.37489/0235-2990-2021-66-9-10-64-78
13. Xiong RG, Li J, Cheng J, Zhou DD, Wu SX, Huang SY, et al. The Role of Gut Microbiota in Anxiety, Depression, and Other Mental Disorders as Well as the Protective Effects of Dietary Components. Nutrients. 2023 Jul 23;15(14):3258. DOI: 10.3390/nu15143258
14. Martín R, Rios-Covian D, Huillet E, Auger S, Khazaal S, Bermúdez-Humarán LG, et al. *Faecalibacterium*: a bacterial genus with promising human health applications. FEMS Microbiol Rev. 2023;5;47(4):fuad039. DOI: 10.1093/femsre/fuad039
15. Geng P, Zhao N, Zhou Y, Harris RS, Ge Y. *Faecalibacterium prausnitzii* regulates carbohydrate metabolic functions of the gut microbiome in C57BL/6 mice. Gut Microbes. 2025;17(1):2455503. DOI: 10.1080/19490976.2025.2455503
16. Miquel S, Leclerc M, Martin R, Chain F, Lenoir M, Raguideau S, et al. Identification of metabolic signatures linked to anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii*. mBio. 2015;21(6):e00300-15. DOI: 10.1128/mBio.00300-15
17. Liu X, Mao B, Gu J, Wu J, Cui S, Wang G, et al. *Blautia* – a new functional genus with potential probiotic properties? Gut Microbes. 2021;13(1):1-21. DOI: 10.1080/19490976.2021.1875796
18. Кукалевская НН, Бажукова ТА, Давидович НВ, Сабаньев МА. Особенности бактерий рода *Blautia* – представителей микробиоты толстой кишки. Бактериология. 2024;9(2):81-88. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-81-88
19. Tap J, Derrien M, Törnblom H, Brazeilles R, Cools-Portier S, Doré J, et al. Identification of an Intestinal Microbiota Signature Associated With Severity of Irritable Bowel Syndrome. Gastroenterology. 2017 Jan;152(1):111-123.e8. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.09.049
20. Simpson CA, Diaz-Arteche C, Elihy D, Schwartz OS, Simmons JG, Cowan CSM. The gut microbiota in anxiety and depression – A systematic review. Clin Psychol Rev. 2021;83:101943. DOI: 10.1016/j.cpr.2020.101943
21. Купина АД, Петров ЮА, Оздоева ИМ. Кишечный и влагалищный микробиоценоз и его влияние на репродуктивное здоровье женщины. Доктор.Ру. 2021;20(1):73-77. DOI: 10.31550/1727-2378-2021-20-1-73-77
22. Haro C, Rangel-Zúñiga OA, Alcalá-Díaz JF, Gómez-Delgado F, Pérez-Martínez P, Delgado-Lista J, et al. Intestinal Microbiota Is Influenced by Gender and Body Mass Index. PLoS One. 2016;26;11(5):e0154090. DOI: 10.1371/journal.pone.0154090
23. Sonnenburg JL, Bäckhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. Nature Reviews Endocrinology. 2016;7;535(7610):56-64. DOI: 10.1038/nature18846
24. Depommier C, Everard A, Druart C, Plovier H, Van Hul M, Vieira-Silva S, et al. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. Nat Med. 2019;25(7):1096-1103. DOI: 10.1038/s41591-019-0495-2
25. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. Science. 2013;6;341(6150):1241214. DOI: 10.1126/science.1241214
26. Gaber M, Wilson AS, Millen AE, Hovey KM, LaMonte MJ, Wactawski-Wende J, et al. Visceral adiposity in postmenopausal women is associated with a pro-inflammatory gut microbiome and immunogenic metabolic endotoxemia. Microbiome. 2024;4;12(1):192. DOI: 10.1186/s40168-024-01901-1
27. Yang X, Xiao H, Zeng Y, Huang L, Ji K, Deng D, et al. Tianwang Buxin Granules Influence the Intestinal Flora in Perimenopausal Insomnia. Biomed Res Int. 2021;16;2021:9979511. DOI: 10.1155/2021/9979511

References

1. Ignatieva EV, Kryukov EV, Chernetsov VA, Rukavitsyn OA. Comorbidity in patients with lymphoproliferative diseases. Clinical Medicine. 2020;96(7):508-14. DOI: 10.30629/0023-2149-2020-98-7-508-514 (In Russian).

2. Baranova EI, Kacap AA, Kolesnik OS, Lebedeva EV. Hypertension in peri- and postmenopausal women – pathophysiological mechanisms and treatment approaches. *Rossiiskij kardiologicheskij zhurnal*. 2023;28(5):99-107. DOI: 10.15829/1560-4071-2023-5439 (In Russian).
3. Liu Y, Zhou Y, Mao T, Huang Y, Liang J, Zhu M, et al. The relationship between menopausal syndrome and gut microbes. *BMC Womens Health*. 2022;8;22(1):437. DOI: 10.1186/s12905-022-02029-w
4. Dohard MI, Allard SM, Gilbert JA. The effects of hormone replacement therapy on the microbiomes of postmenopausal women. *Climacteric*. 2023 Jun;26(3):182-192. DOI: 10.1080/13697137.2023.2173568
5. Yakushevskaya OV, Yureneva SV, Protasova AE. Estrogen metabolism: why is it so important to maintain balance? *Gynecology*. 2019;21(6):31-35. DOI: 10.26442/20795696.2019.6.190752 (In Russian).
6. Xie X, Song J, Wu Y, Li M, Guo W, Li S, et al. Study on gut microbiota and metabolomics in postmenopausal women. *BMC Womens Health*. 2024;15;24(1):608. DOI: 10.1186/s12905-024-03448-7
7. He J, Xu S, Zhang B, Xiao C, Chen Z, Si F, et al. Gut microbiota and metabolite alterations associated with reduced bone mineral density or bone metabolic indexes in postmenopausal osteoporosis. *Aging (Albany NY)*. 2020 May 11;12(9):8583-8604. DOI: 10.18632/aging.103168
8. Wang Z, Chen K, Wu C, Chen J, Pan H, Liu Y, et al. An emerging role of *Prevotella histicola* on estrogen deficiency-induced bone loss through the gut microbiota-bone axis in postmenopausal women and in ovariectomized mice. *Am J Clin Nutr*. 2021 Oct 4;114(4):1304-1313. DOI: 10.1093/ajcn/nqab194
9. Ozaki D, Kubota R, Maeno T, Abdelhakim M, Hitosugi N. Association between gut microbiota, bone metabolism, and fracture risk in postmenopausal Japanese women. *Osteoporos Int*. 2021 Jan;32(1):145-156. DOI: 10.1007/s00198-020-05728-y
10. Kou J, He C, Cui L, Zhang Z, Wang W, Tan L, et al. Discovery of Potential Biomarkers for Postmenopausal Osteoporosis Based on Untargeted GC/LC-MS. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Apr 19;13:849076. DOI: 10.3389/fendo.2022.849076
11. Wang H, Liu J, Wu Z, Zhao Y, Cao M, Shi B, et al. Gut microbiota signatures and fecal metabolites in postmenopausal women with osteoporosis. *Gut Pathog*. 2023 Jul 6;15(1):33. DOI: 10.1186/s13099-023-00553-0
12. Dbar SD. A new generation of probiotics – psychobiotics, their purpose and functions. *Antibiotiki i himioterapiya*. 2021;66(9-10):64-80. DOI: 10.37489/0235-2990-2021-66-9-10-64-78 (In Russian).
13. Xiong RG, Li J, Cheng J, Zhou DD, Wu SX, Huang SY, et al. The Role of Gut Microbiota in Anxiety, Depression, and Other Mental Disorders as Well as the Protective Effects of Dietary Components. *Nutrients*. 2023 Jul 23;15(14):3258. DOI: 10.3390/nu15143258
14. Martín R, Rios-Covian D, Huillet E, Auger S, Khazaal S, Bermúdez-Humarán LG, et al. *Faecalibacterium*: a bacterial genus with promising human health applications. *FEMS Microbiol Rev*. 2023;5;47(4):fuad039. DOI: 10.1093/femsre/fuad039
15. Geng P, Zhao N, Zhou Y, Harris RS, Ge Y. *Faecalibacterium prausnitzii* regulates carbohydrate metabolic functions of the gut microbiome in C57BL/6 mice. *Gut Microbes*. 2025;17(1):2455503. DOI: 10.1080/19490976.2025.2455503
16. Miquel S, Leclerc M, Martin R, Chain F, Lenoir M, Raguideau S, et al. Identification of metabolic signatures linked to anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii*. *mBio*. 2015;21;6(2):e00300-15. DOI: 10.1128/mBio.00300-15
17. Liu X, Mao B, Gu J, Wu J, Cui S, Wang G, et al. *Blautia* – a new functional genus with potential probiotic properties? *Gut Microbes*. 2021;13(1):1-21. DOI: 10.1080/19490976.2021.1875796
18. Kukalevskaya NN, Bazhukova TA, Davidovich NV, Sabanaev MA. Features of bacteria of the genus *Blautia* – representatives of the microbiota of the large intestine. *Bakteriologiya*. 2024;(9(2)):81-88. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-81-88 (In Russian).
19. Tap J, Derrien M, Törnblom H, Brazeilles R, Cools-Portier S, Doré J, et al. Identification of an Intestinal Microbiota Signature Associated With Severity of Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*. 2017 Jan;152(1):111-123.e8. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.09.049
20. Simpson CA, Diaz-Arteche C, Eliby D, Schwartz OS, Simmons JG, Cowan CSM. The gut microbiota in anxiety and depression – A systematic review. *Clin Psychol Rev*. 2021;83:101943. DOI: 10.1016/j.cpr.2020.101943
21. Kupina AD, Petrov YuA, Ozdoeva IM. Intestinal and vaginal microbiocenosis and its impact on female reproductive health. *Doctor.Ru*. 2021;20(1):73-77. DOI: 10.31550/1727-2378-2021-20-1-73-77 (In Russian).
22. Haro C, Rangel-Zúñiga OA, Alcalá-Díaz JF, Gómez-Delgado F, Pérez-Martínez P, Delgado-Lista J, et al. Intestinal Microbiota Is Influenced by Gender and Body Mass Index. *PLoS One*. 2016;26;11(5):e0154090. DOI: 10.1371/journal.pone.0154090
23. Sonnenburg JL, Bäckhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*. 2016;7;535(7610):56-64. DOI: 10.1038/nature18846
24. Depommier C, Everard A, Druart C, Plovier H, Van Hul M, Vieira-Silva S, et al. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nat Med*. 2019;25(7):1096-1103. DOI: 10.1038/s41591-019-0495-2
25. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*. 2013;6;341(6150):1241214. DOI: 10.1126/science.1241214
26. Gaber M, Wilson AS, Millen AE, Hovey KM, LaMonte MJ, Wactawski-Wende J, et al. Visceral adiposity in postmenopausal women is associated with a pro-inflammatory gut microbiome and immunogenic metabolic endotoxemia. *Microbiome*. 2024;4;12(1):192. DOI: 10.1186/s40168-024-01901-1
27. Yang X, Xiao H, Zeng Y, Huang L, Ji K, Deng D, et al. Tianwang Buxin Granules Influence the Intestinal Flora in Perimenopausal Insomnia. *Biomed Res Int*. 2021;16;2021:9979511. DOI: 10.1155/2021/9979511

Информация о соавторах:

Смертина Марина Леонидовна, аспирант кафедры микробиологии и вирусологии Кировского государственного медицинского университета

Корнеева Елизавета Евгеньевна, студент Кировского государственного медицинского университета

Information about co-authors:

Marina L. Smertina, postgraduate student of the Department of Microbiology and Virology, Kirov State Medical University

Elizaveta E. Korneeva, student, Kirov State Medical University

Микробиом кожи и его клиническое значение

А.М.Морозов^{1,2}, А.Н.Сергеев^{1,2}, Ю.В.Червинец¹, М.Е.Пискарева¹

¹ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России, Тверь, Российская Федерация;

²Городская клиническая больница №7 Министерства здравоохранения Тверской области, Тверь, Российская Федерация

Микробиом кожи человека разнообразен и зависит от множества факторов, таких как пол, возраст, этническая принадлежность и географическое положение. Различные области кожи преимущественно колонизированы микроорганизмами, наиболее адаптированными к конкретным микросредам в зависимости от температуры, выработки кожного сала и уровня потоотделения. Сухие участки кожи наиболее благоприятны для представителей рода *Aspergillus*, *Flavonacterium*, *Proteus* и *Xanthobacter*, в то время как на влажных больше распространение получили *Staphylococcus*, *Corynebacterium* и β -*Proteobacteria*. Исследование микробного состава кожи способно значительно улучшить качество оказываемой хирургической помощи, а также снизить количество послеоперационных осложнений инфекционного генеза. Понимание механизмов, лежащих в основе данных нарушений, влияющих на микробиом, и взаимодействия между микробиомом кожи и инфекционными агентами потенциально позволит использовать новые стратегии профилактики лечения заболеваний.

Ключевые слова: микробиом, передняя брюшная стенка, микроорганизмы, патогены, инфекция, микробиология

Для цитирования: Морозов А.М., Сергеев А.Н., Червинец Ю.В., Пискарева М.Е. Микробиом кожи и его клиническое значение. Бактериология. 2025; 10(3): 83–89. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-83-89

The skin microbiome and its clinical significance

A.M.Morozov^{1,2}, A.N.Sergeev^{1,2}, Yu.V.Chervinets¹, M.E.Piskareva¹

¹Tver State Medical University, Tver, Russian Federation;

²Municipal Clinical Hospital No 7, Ministry of Health of the Tver Region, Tver, Russian Federation

The human skin microbiome is diverse and depends on many factors such as gender, age, ethnicity and geographical location. Different areas of the skin are predominantly colonised by microorganisms that are best adapted to specific microenvironmental conditions, depending on temperature, sebum production and sweating. Dry skin areas are most favourable for *Aspergillus*, *Flavonacterium*, *Proteus* and *Xanthobacter*, while *Staphylococcus*, *Corynebacterium* and β -*Proteobacteria* are more prevalent in moist areas. The study of the microbial composition of the skin can significantly improve the quality of surgical care and reduce the number of postoperative complications of infectious genesis. Understanding the mechanisms underlying these disorders affecting the microbiome and the interactions between the skin microbiome and infectious agents will potentially enable new strategies to prevent disease management.

Key words: microbiome, anterior abdominal wall, microorganisms, pathogens, infection, microbiology

For citation: Morozov A.M., Sergeev A.N., Chervinets Yu.V., Piskareva M.E. The skin microbiome and its clinical significance. Bacteriology. 2025; 10(3): 83–89. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-83-89

Кожа является самым крупным органом человеческого тела. Она отделяет внутреннюю среду организма от внешней и представляет собой первую линию защиты от экзогенных патогенов, вследствие чего обладает повышенным риском инфицирования и повреждения. Одной из главных функций кожи является барьерная, обеспечиваемая как за счет ее собственных клеток, так и за счет микроорганизмов, обитающих на ее поверхности [1]. Данные микроорганизмы представляют собой динамическую экосистему (микробиом), включающую различные виды бактерий, гри-

бов, вирусов. С практической точки зрения наибольший интерес представляют резидентные (постоянные) микроорганизмы, формирующие относительно фиксированные колонии, способные к самостоятельному восстановлению популяции при различных структурных повреждениях кожи. Считается, что данная группа представлена приносящими организму пользу комменсалами, которые принимают активное участие в поддержании барьерной функции кожи, а также в основных физиологических процессах, происходящих на ее поверхности [2–4].

Для корреспонденции:

Морозов Артём Михайлович, кандидат медицинских наук, доцент кафедры общей хирургии Тверского государственного медицинского университета; врач-хирург Городской клинической больницы №7 Министерства здравоохранения Тверской области

Адрес: 170100, Тверь, ул. Советская, 4
ORCID: 0000-0003-4213-5379

Статья поступила 13.02.2025, принята к печати 30.09.2025

For correspondence:

Artem M. Morozov, PhD, MD, Associate Professor, Associate Professor of the Department of General Surgery Tver State Medical University; Surgeon of Municipal Clinical Hospital No 7, Ministry of Health of the Tver Region

Address: 4 Sovetskaya str., Tver, 170100, Russian Federation
ORCID: 0000-0003-4213-5379

The article was received 13.02.2025, accepted for publication 30.09.2025

Тема микробиома кожи не теряет своей актуальности на протяжении последних десятилетий, и с каждым годом интерес медицинского сообщества к более детальному изучению кожной микрофлоры и микробиоты только возрастает. В последующих разделах будут представлены последние сведения о микробиоме передней брюшной стенки, включая его состав и структуру в норме и при некоторых наиболее распространенных патологических состояниях, а также механизмы взаимодействия входящих в его состав микроорганизмов между собой и с организмом в целом.

Целью настоящего исследования является анализ данных о составе микробиома кожи, его роли в норме и при патологии, а также о клиническом значении в практике.

Материалы и методы

В ходе настоящего исследования был проведен анализ актуальных литературных источников на тему состава и роли микробиома передней брюшной стенки в норме и при патологии. Базой для поиска информации послужили MedLine (PubMed), Научная электронная библиотека, интегрированная с Российским индексом научного цитирования eLIBRARY, а также Scopus и Web of Science.

Результаты исследования и их обсуждение

Комменсальные микроорганизмы находятся в симбиотических отношениях с организмом хозяина. Данное взаимодействие способствует стабильности микробиома и целостности кожи. Понимание и поддержание хрупкого баланса между кожей и микробиомом являются важными шагами для познания механизмов, непосредственно отвечающих за поддержание здорового кожного покрова [5, 6].

Резидентные микроорганизмы обеспечивают первую линию защиты от вторжения патогенов. *Staphylococcus epidermidis* и некоторые другие бактерии способны напрямую взаимодействовать с кератиноцитами, вызывая выработку антимикробных пептидов через сигнализацию иммунных клеток [7–9]. Выделяемые β -дефензины проявляют бактерицидные свойства в отношении *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* [10]. *S. epidermidis* также выделяет протеазу, ускоряет процесс заживления ран за счет своего противовоспалительного действия и обладает противоопухолевой активностью [11, 12]. Остальные коагулазоотрицательные стафилококки также производят бактериоцины, ограничивающие выживание патогенных бактерий на поверхности кожи, и соединения, обладающие иммуномодулирующим и противовоспалительным действием [13].

S. aureus в коже может преобразовывать гистидин в аминокислоту, которая в дальнейшем превращается в трансурокаиновую кислоту, тем самым обеспечивая защиту кожи от ультрафиолетового излучения. Представители рода *Corynebacterium* способны изменять липидный состав на поверхности кожи и обеспечивать толстый барьер кожного сала [7]. *Lactobacillus* spp. предотвращают колонизацию патогенов и производят противовоспалительные вторичные метаболиты [9]. Параллельно хозяин обеспечивает микроорганизмы питательными веществами, тем самым формируя и поддерживая постоянный состав микробиома [5].

Основные виды резидентных микроорганизмов

Абсолютное большинство симбиотных бактерий здоровой кожи у людей относится к одному из четырех типов [14, 15]:

Actinobacteria (51,8%): роды *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Actinobacterium*, *Brevibacterium*;

Firmicutes (24,4%): роды *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Finegoldia*;

Proteobacteria (16,5%): роды *Paracoccus*, *Haematobacter*;

Bacteroidetes (6,3%): роды *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Chryseobacterium*.

Помимо этого, до 4% занимают археи, среди наиболее распространенных родов которых можно выделить *Thaumarchaeota* и *Euryarchaeota* [14].

Макроскопически на коже можно обнаружить множество различных карманов, инвагинаций и ниш, каждая из которых обладает уникальной микросредой: отличается липидным и пептидным составом, а также показателями pH и температуры. Например, усредненные значения температуры и pH в околопупочной области составляют 33,3°C и 5,35–5,55, а в паховой – 36,1°C и 6,22 соответственно. При этом показатели pH довольно сильно варьируют в зависимости от половой принадлежности и состояния здоровья человека [16, 17].

Микробное сообщество кожи человека разнообразно и зависит от множества факторов, таких как пол, возраст, этническая принадлежность и географическое положение. Различные области кожи населяются разными микроорганизмами, адаптирующимися к конкретным микросредам в зависимости от температуры, выработки кожного сала и уровня потоотделения на занятой ими нише [18, 19].

По физиологическим свойствам участки кожи можно разделить на три основные группы: сухие, влажные и сальные [20]. Вместе с этим В. Dréno выделяет еще одну группу: в нее входят дерма, волосные фолликулы, сальные и потовые железы [17]. Особенности каждого из упомянутых участков создают отличные друг от друга по уровню выделяемых липидов и влаги условия, способствующие распространению различных видов микроорганизмов [21]. Сухие участки кожи наиболее благоприятны для представителей рода *Aspergillus*, *Flavonacterium*, *Proteus* и *Xanthobacter*, в то время как на влажных участках кожи большее распространение получили *Staphylococcus*, *Corynebacterium* и β -*Proteobacteria* [22, 23]. Кожа передней брюшной стенки преимущественно представлена сухими участками, исключение составляют ее нижняя часть и пупочная область, где влажность сравнительно выше [24].

Умбиликальная область имеет важное клиническое значение в абдоминальной хирургии, так как является наиболее распространенным местом доступа в брюшную полость, при этом данная область обладает повышенной влажностью, что способствует бактериальной колонизации [25]. Вместе с тем большинство послеоперационных инфекционных осложнений вызваны внутрибрюшным инфицированием, а не микрофлорой кожи [26]. Микробиом пупочной области в норме представлен родами *Staphylococcus*, *Corynebacterium* и типом *Proteobacteria*, при этом могут выделяться транзиторные микроорганизмы, например бактерии рода *Enterococcus* [27]. Однако в отдельных случаях, при пренебрежении правилами личной гигиены, микробиом претерпевает значи-

тельные изменения: представители резидентной флоры уменьшаются в количестве или полностью исчезают, появляются бактерии из группы анаэробов, такие как *Mobiluncus*, *Arcanobacterium* и *Peptoniphilus*, что говорит о необходимости уделения особого внимания гигиеническим манипуляциям при подготовке больного к оперативному вмешательству. Исследование J.Kleeff et al. продемонстрировало, что антисептическая подготовка кожи не способна полностью избавиться от микрофлоры пупочной области 24,7% пациентов [28].

Нижняя часть передней брюшной стенки также является одним из распространенных мест доступа при операциях на брюшной полости, малом тазу, а также тазобедренном суставе, при этом микробиологический анализ показывает наличие как аэробной, так и анаэробной флоры. Наибольшую долю при этом занимают представители родов *Staphylococcus*, *Corynebacterium* и *Cutibacterium*. Также могут быть выявлены представители типов *Pseudomonadota*, *Bacillota*, *Bacteroidota* и *Actinomycetota*. P.M.Anderson et al. провели исследование, направленное на изучение изменений микробиома у людей с ожирением, по результатам которого было выявлено увеличение распространенности бактерий порядка *Enterobacterales*, в частности *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* и *Enterobacter cloacae* [29]. Данные результаты могут быть объяснены близостью к урогенитальной области, а также, возможно, снижением эффективности местных гигиенических процедур у больных за счет нависания брюшного фартука, что также создает анаэробные условия с повышенной влажностью, наиболее благоприятные для персистенции соответствующей флоры, способной привести к развитию инфекционных осложнений. В статье D.B.Buchalter et al. было отмечено увеличение частоты инфекций области хирургического вмешательства, вызванных грамотрицательными микроорганизмами, у больных после эндопротезирования тазобедренного сустава через прямой передний доступ, что связано с особенностями микробиома паховой области [30].

В то время как поверхностные слои кожи демонстрируют большое видовое разнообразие, в более глубоких слоях отмечается значительное содержание представителей классов *Clostridiales* и *Bacteroidetes*. Подобные отличия хорошо заметны при использовании различных методов забора биологического материала – мазки тампоном помогают оценить состав поверхностных слоев, а биопсия – более глубоких [31].

Половые и этнические особенности микробиома

Различия видового состава мужского и женского микробиома развиваются за счет наличия характерных особенностей кожи у людей разного пола: толщины кожи, количества волос, потовых и сальных желез. Микробиом женской кожи характеризуется большим разнообразием видов, чем у мужчин [32]. Предположительно, данное разнообразие могло быть обеспечено благодаря меньшей толщине кожи, более низкому показателю pH и менее интенсивному потоотделению [33]. Половые гормоны, которые влияют на функционирование иммунных клеток, также имеют решающее значение [8]. J.-H.Jo et al. предположили, что пол может оказать повышенное влияние на структуру микробиома в период

полового созревания [34]. В своем исследовании M.H.Y.Leung et al. показали, что для мужчин характерно обилие *Cutibacterium* и *Staphylococcus*, в то время как *Streptococcus* был более распространен среди женщин [35]. В то же время при изучении распределения грибов *Malassezia* A.Prohic et al. не выявили значимого влияния пола. При этом было отмечено существенное влияние на состав и разнообразие архейного сообщества [36]. J.Oh et al. при исследовании мужчин и женщин в возрасте от 2 до 40 лет, независимо от их возраста, на основании мазков с сухих участков кожи также не выявляли существенных различий, связанных с полом [37]. Изучая участки кожи с повышенной влажностью, C.Callewaert et al. выделили две основные группы в зависимости от преимущественной колонизации за счет *Staphylococcus* или *Corynebacterium* [38]: у женщин преимущественно определялись представители рода *Staphylococcus*, в то время как у мужчин чаще определялись *Corynebacterium*. Подобное распределение может быть связано с более высокой чувствительностью *Corynebacterium* к противомикробным агентам, персистирующим на коже человека, и, в особенности, к низким значениям pH (по сравнению с *Staphylococcus* spp.). В то же время M.Li et al. отметили большее количество *Corynebacterium* spp. у мужчин, что менее характерно для женщин [39].

Среди генетических факторов, формирующих микробиом кожи, этническая принадлежность является вторичной, она способствует изменению микробиома кожи и достаточно сильно связана с образом жизни, прежде всего с гигиеническими привычками [40].

Возрастные изменения микробиома

Несмотря на то, что микробиом кожи человека является относительно стабильным с течением времени, старение – один из основных факторов, влияющих на изменение его состава. Взаимосвязь между данными процессами представляет особый интерес [41]. Исследования, приведенные в статье Z.Li et al., подтвердили различия между составами кожного микробиома у молодых и пожилых людей [42].

В коже пожилых людей отмечается уменьшение размеров мелких сосудов, сальных и потовых желез, а также снижение запасов питательных веществ. Значительно снижается барьерная функция, понижается резистентность к патогенам внешней среды, а также способность сохранять общую целостность кожных покровов и поддерживать гомеостаз в системе человек–микробиом [43]. При этом показатель pH имеет тенденцию к повышению, сдвигая среду кожи к более щелочным значениям, что создает более благоприятные условия для патогенных микроорганизмов [44]. Кожа становится более сухой за счет снижения потоотделения и салообразования, что затрудняет удаление патогенной флоры с ее поверхности и защиту от ее воздействия [45]. Подобные изменения приводят к сокращению численности резидентных микроорганизмов, например типа *Firmicutes*, что, в свою очередь, влияет на регуляцию иммунных функций и снижение биосинтеза и метаболизма необходимых веществ: повышается восприимчивость к инфекциям, снижается активность антимикробных пептидов. Помимо этого, сокращаются популяции *Staphylococcus*, *Cutibacterium* и *Acinetobacter* [46], но увеличивается число *Corynebacterium*, *Proteobacteria*

и *Streptococcus*, что также может негативно влиять на состояние кожи возрастных людей [42].

Изменения микробиома в патологии

В некоторых случаях нарушения симбиотического состояния и соотношения бактериальных фракций микробиома могут привести к развитию заболеваний. Чрезмерное использование антибиотиков и нездоровое питание представляют серьезную опасность для состава микробиома, при этом дисбаланс в микробном сообществе может вызвать патологические состояния [47, 48]. Многие распространенные патологические состояния, включая хронические раневые процессы, инфекции кожи и мягких тканей, а также дерматологические заболевания, связаны с изменениями в микробиоме и называются дисбактериозами [49].

Понимание механизмов, лежащих в основе данных нарушений, влияющих на микробиом, и взаимодействия между микробиомом кожи и инфекционными агентами потенциально позволит использовать новые стратегии лечения заболеваний [47].

Изменения микробиома при заживлении ран

Как было описано выше, комменсальные организмы кожи находятся в постоянном взаимодействии с иммунной системой и, таким образом, участвуют в заживлении ран. C. Leonel et al. обобщили современные знания по данной проблеме, которые представляются несколько противоречивыми [50]. В одних исследованиях отмечается, что отсутствие комменсальных микроорганизмов на коже положительно влияет на закрытие раны во время заживления [51], в другом – присутствие *S. epidermidis* было отмечено как положительный фактор, связанный с нетрадиционными механизмами восстановления, характерными для комменсальных бактерий, через привлечение регуляторных CD8 Т-лимфоцитов и Toll-подобных рецепторов [52]. *S. epidermidis* активирует Toll-подобные рецепторы 2 для усиления реакции кератиноцитов на патогены и выделения антимикробных пептидов, а также ингибирует Toll-подобные рецепторы 3, активирующие воспаление, за счет чего помогает ускорить процесс заживления ран [7]. Таким образом, можно сделать вывод о благоприятном влиянии микробиома кожи и негативном эффекте дисбактериоза на процесс заживления ран. Однако, учитывая расхождения во мнениях, необходимо дальнейшее проведение исследований для более точного определения роли микробиома [32].

Изменения микробиома при инсулинорезистентности и хроническом раневом процессе

Этиология и патогенез инсулинорезистентности тесно связаны с микробиомом человека. Пациенты с нарушением баланса между инсулином и глюкозой демонстрируют смещенный состав микробиома в кишечнике, коже и других участках тела, отражающий дисбактериоз, характеризующийся измененным микробным альфа-разнообразием, снижением стабильности состава и большей изменчивостью. Нарушение структуры слизистой оболочки и кожного барьера кожи часто связано с инсулинорезистентностью, что дополнительно способно усугубить уже нарушенное соотношение резидентных микроорганизмов [14, 53].

Микробиота кожи, особенно специфические патогены, способствует инфекции хронических ран. Часто этот процесс связан с *S. aureus*, обладающей генами устойчивости к антибиотикам, и, как следствие, может привести к тяжелой инфекции кожи и мягких тканей. Штаммы *S. aureus* способны снижать барьерную функцию кожи и активировать патологические иммунные реакции как на ее поверхности, так и в организме в целом [5, 53]. Вместе с этим *Roseomonas mucosa* продемонстрировал способность к подавлению роста *S. aureus* как в экспериментальной модели, так и непосредственно на коже человека, способствуя выработке интерлейкина-6, показывая возможность восстановления новых штаммов в микробиоме кожи и использования их для улучшения дерматологических заболеваний [54].

S. aureus и *P. aeruginosa* наиболее часто выделяют из хронических ран. Ко-инфекция *S. aureus* и *P. aeruginosa* является наиболее опасной в сравнении с одиночными инфекциями, при этом численность *Staphylococcus* и анаэробных бактерий отрицательно коррелирует с глубиной раны: наблюдается положительная корреляция между удлинением раны, микробным разнообразием и численностью *P. aeruginosa* и отрицательная – с численностью *S. aureus*. Иначе говоря, *S. aureus*, как правило, ассоциируется с острыми поверхностными язвами, а *P. aeruginosa* и другие анаэробные бактерии обычно выявляются при глубоких хронических язвах. Кроме того, упомянутые микроорганизмы способны препятствовать заживлению значительных хронических язв в фазе воспаления. Они экспрессируют поверхностные белки и факторы вирулентности, ингибируя и замедляя процесс заживления ран [10, 55, 56].

Инфекция области хирургического вмешательства и микробиом

Резидентная флора области хирургического вмешательства является наиболее распространенным фактором, вызывающим инфекционные осложнения в послеоперационном периоде [57], однако это оспаривается J. Kleeff et al., которые утверждают, что микробиом кожи значительно реже вызывает развитие послеоперационных инфекций, и считают главной их причиной эндогенное загрязнение [28]. В целом наиболее часто ответственными за развитие инфекций области хирургического вмешательства являются: *S. aureus*, *Enterococcus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Streptococcus*, *Enterobacter*, *Proteus* sp., *K. pneumoniae* и *Serratia* sp. [28, 57]. В частности, *S. aureus* представляет особую опасность, так как демонстрирует относительную устойчивость к антимикробным пептидам, синтезируемым эпителиоцитами и фагоцитами. При этом повышение показателя pH до 6–7, негативно влияющее на большую часть представителей кожной флоры, создает более благоприятную среду для этой бактерии, а также для *Streptococcus pyogenes* [16, 58].

В работе L. Prieto-Borja et al. рассмотрена проблематика инфекционных осложнений в области установки дренажных систем у пациентов, перенесших оперативные вмешательства на брюшной полости. Одним из главных факторов риска развития данных осложнений является продолжительность использования дренажной системы, при этом наблюдается взаимосвязь между развитием инфекции и использованием дренажа в течение 3 и более дней. При микробио-

логическом исследовании наиболее часто выделялись группы возбудителей *Enterobacteriae* (*Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Morganella morganii*), *P. aeruginosa*, а также представители родов *Candida* и *Enterococcus*. Коагулазоотрицательные стафилококки, несмотря на то что были наиболее распространенной изолированной группой бактерий, не были связаны с развитием инфекционных осложнений [59].

Варианты снижения микробной нагрузки на область хирургического вмешательства стали одними из основных направлений профилактики. Регулярное использование системных антибиотиков, направленных против данных микроорганизмов, было эффективным в снижении частоты послеоперационных осложнений [32, 57].

Взаимосвязь кожного и кишечного микробиомов

Дополнительно следует выделить связь между микробиомами кожи и кишечника, при этом некоторые исследователи предлагают рассматривать их как единую систему [60]. Кожный и кишечный барьеры, действительно, во многом похожи: они имеют схожее строение и постоянно контактируют с внешней средой [61]. Высокая скорость клеточного обновления эпителиальных тканей кожи и кишечника снижает адгезию транзитной флоры и риск развития инфекционных процессов [5]. Микробиом кишечника влияет на кожу и другие системы органов. Подобная связь обеспечивается за счет иммунной системы и необходима для поддержания гомеостаза и регуляции местных иммунологических реакций [61–63]. Среди возможных механизмов данного влияния можно выделить регуляцию внекишечных Т-клеток, развитие пероральной иммунной толерантности через регуляторные Т-клетки, синтез короткоцепочечных жирных кислот, а также регуляцию иммунных и воспалительных реакций. Кишечный микробиом и его метаболиты индуцируют иммунокомпетентные клетки и цитокины, которые с кровью и лимфой попадают в системный кровоток и распространяются по всему организму [64].

Существует двунаправленная связь между дисбактериозом кишечника и кожи. Многие исследования подтверждают, что дисбаланс кишечного микробиома тесно связан с измененным иммунным ответом и способен приводить к различным заболеваниям кожи [7, 8], в свою очередь, многие воспалительные заболевания кожи могут приводить к изменениям микробиома кишечника [5]. D.Yan et al., а также X.Zhang et al. выявили существенные отличия в составе микробной флоры кишечника у здоровых людей и больных псориазом, у последних было изменено соотношение популяций *Firmicutes* и *Bacteroidetes* [65, 66].

Заключение

Исследования показывают, что кожа тесно связана с заселяющим ее микробиомом и микробное сообщество, персистирующее на ее поверхности, обладает большим потенциалом влияния на здоровье человека. Особый интерес кожный микробиом представляет в хирургической практике, так как в случае оперативного лечения неизбежным является нарушение целостности кожного покрова и, как следствие, повреждение внутрисистемного гомеостаза.

Более детальное исследование колонизирующих кожу микроорганизмов может способствовать более эффективной диагностике и выявлению взаимосвязей между состоянием микробиома и патогенезом инфекционных осложнений области хирургического вмешательства, а также разработке более эффективных методов их профилактики и лечения.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Financial support

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests.

Литература / References

1. Lee HJ, Kim M. Skin Barrier Function and the Microbiome. *Int J Mol Sci*. 2022 Oct 28;23(21):13071. DOI: 10.3390/ijms232113071
2. Gallo RL. Human Skin Is the Largest Epithelial Surface for Interaction with Microbes. *J Invest Dermatol*. 2017 Jun;137(6):1213-1214. DOI: 10.1016/j.jid.2016.11.045
3. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Mar;16(3):143-155. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.157
4. Bates M. The Role of the Skin Microbiome in Health and Disease. *IEEE Pulse*. 2022 Jul-Aug;13(4):8-13. DOI: 10.1109/MPULS.2022.3191384
5. Yang Y, Qu L, Mijakovic I, Wei Y. Advances in the human skin microbiota and its roles in cutaneous diseases. *Microb Cell Fact*. 2022 Aug 29;21(1):176. DOI: 10.1186/s12934-022-01901-6
6. Ueroi A, Bartow-McKenney C, Zheng Q, Flowers L, Campbell A, Knight SAB, et al. Commensal microbiota regulates skin barrier function and repair via signaling through the aryl hydrocarbon receptor. *Cell Host Microbe*. 2021 Aug 11;29(8):1235-1248.e8. DOI: 10.1016/j.chom.2021.05.011
7. Habeebuddin M, Karnati RK, Shiroorkar PN, Nagaraja S, Asdaq SMB, Khalid Anwer M, et al. Topical Probiotics: More Than a Skin Deep. *Pharmaceutics*. 2022 Mar 3;14(3):557. DOI: 10.3390/pharmaceutics14030557
8. Skowron K, Bauza-Kaszewska J, Kraszewska Z, Wiktorczyk-Kapischke N, Grudlewska-Buda K, Kwiecińska-Piróg J, et al. Human Skin Microbiome: Impact of Intrinsic and Extrinsic Factors on Skin Microbiota. *Microorganisms*. 2021 Mar 5;9(3):543. DOI: 10.3390/microorganisms9030543
9. Olunoiki E, Rehner J, Bischoff M, Koshel E, Vogt T, Reichrath J, et al. Characteristics of the Skin Microbiome in Selected Dermatological Conditions: A Narrative Review. *Life (Basel)*. 2022 Sep 12;12(9):1420. DOI: 10.3390/life12091420
10. Zhu Y, Yu X, Cheng G. Human skin bacterial microbiota homeostasis: A delicate balance between health and disease. *mLife*. 2023 Jun 4;2(2):107-120. DOI: 10.1002/mlf2.12064
11. Zheng Y, Hunt RL, Villaruz AE, Fisher EL, Liu R, Liu Q, et al. Commensal *Staphylococcus epidermidis* contributes to skin barrier homeostasis by generating protective ceramides. *Cell Host Microbe*. 2022 Mar 9;30(3):301-313.e9. DOI: 10.1016/j.chom.2022.01.004
12. Nakatsuji T, Chen TH, Butcher AM, Trzoss LL, Nam S-J, Shirakawa KT, et al. A commensal strain of *Staphylococcus epidermidis* protects against skin neoplasia. *Sci Adv*. 2018;4:eaa04502. DOI: 10.1126/sciadv.aao4502

13. Nakatsuji T, Gallo RL. The role of the skin microbiome in atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2019;122:263-269. DOI: 10.1016/j.anai.2018.12.003
14. Zhou X, Shen X, Johnson JS, Spakowicz DJ, Agnello M, Zhou W, et al. Longitudinal profiling of the microbiome at four body sites reveals core stability and individualized dynamics during health and disease. *Cell Host Microbe*. 2024 Apr 10;32(4):506-526.e9. DOI: 10.1016/j.chom.2024.02.012
15. Gardiner M, Vicaretti M, Sparks J, Bansal S, Bush S, Liu M, et al. A longitudinal study of the diabetic skin and wound microbiome. *Peer J*. 2017 Jul 20;5:e3543. DOI: 10.7717/peerj.3543
16. Морозов АМ, Беляк МА, Соболев ЕА, Пискарева МЕ, Морозова АД. Анализ микробиоты кожи пациента и его роль в клинической практике. *Врач*. 2023;34(2):10-14. / Morozov AM, Belyak MA, Sobol EA, Piskareva ME, Morozova AD. Skin microbiota analysis in a patient and its role in clinical practice. *Vrach*. 2023;34(2):10-14. DOI: 10.29296/25877305-2023-02-02 (In Russian).
17. Dréno B, Arviiskaia E, Berardesca E, Gontijo G, Sanchez Viera M, Xiang LF, et al. Microbiome in healthy skin, update for dermatologists. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016 Dec;30(12):2038-2047. DOI: 10.1111/jdv.13965
18. Ruuskanen MO, Erawijantari PP, Havulinna AS, Liu Y, Méric G, Tuomilehto J, et al. Gut Microbiome Composition Is Predictive of Incident Type 2 Diabetes in a Population Cohort of 5,572 Finnish Adults. *Diabetes Care*. 2022 Apr 1;45(4):811-818. DOI: 10.2337/dc21-2358
19. Prescott SL, Larcombe DL, Logan AC, West C, Burks W, Caraballo L, et al. The skin microbiome: Impact of modern environments on skin ecology, barrier integrity, and systemic immune programming. *World Allergy Organ. J*. 2017;10:29. DOI: 10.1186/s40413-017-0160-5
20. Roswall J, Olsson LM, Kovatcheva-Datchary P, Nilsson S, Tremaroli V, Simon MC, et al. Developmental trajectory of the healthy human gut microbiota during the first 5 years of life. *Cell Host Microbe*. 2021 May 12;29(5):765-776.e3. DOI: 10.1016/j.chom.2021.02.021
21. Zhang XE, Zheng P, Ye SZ, Ma X, Liu E, Pang YB, et al. Microbiome: Role in Inflammatory Skin Diseases. *J Inflamm Res*. 2024 Feb 15;17:1057-1082. DOI: 10.2147/JIR.S441100
22. Lloyd-Price J, Arze C, Ananthakrishnan AN, Schirmer M, Avila-Pacheco J, Poon TW, et al. Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. *Nature*. 2019 May;569(7758):655-662. DOI: 10.1038/s41586-019-1237-9
23. Nielsen MC, Jiang SC. Alterations of the human skin microbiome after ocean water exposure. *Mar Pollut Bull*. 2019 Aug;145:595-603. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2019.06.047
24. Cundell AM. Microbial Ecology of the Human Skin. *Microb. Ecol*. 2018;76:113-120. DOI: 10.1007/s00248-016-0789-6
25. Tanaka K, Mikami T, Ebata Y, Kato H, Miyano G, Ishii J, et al. Umbilical microflora and pediatric surgery. *Pediatr Surg Int*. 2022 Feb;38(2):345-349. DOI: 10.1007/s00383-021-05026-6
26. Aiolfi A, Asti E, Costa E, Ferrari D, Bonitta G, Gaia P, et al. Umbilical Microbiome and Laparoscopic Surgery: A Descriptive Clinical Study. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2018 Oct;28(10):1196-1201. DOI: 10.1089/lap.2018.0140
27. Yano T, Okajima T, Tsuchiya S, Tsujimura H. Microbiota in Umbilical Dirt and Its Relationship with Odor. *Microbes Environ*. 2023;38(3):ME23007. DOI: 10.1264/jsme2.ME23007
28. Kleeff J, Erkan M, Jäger C, Menacher M, Gebhardt F, Hartel M. Umbilical Microflora, Antiseptic Skin Preparation, and Surgical Site Infection in Abdominal Surgery. *Surg Infect (Larchmt)*. 2015 Aug;16(4):450-4. DOI: 10.1089/sur.2014.163
29. Anderson PM, Frank T, Herz M, Kurza O, Rudert M, Heinz T, et al. Qualitative Comparison of Cultured Skin Microbiota From the Inguinal Region of Obese and Nonobese Patients Eligible for Hip Arthroplasty. *Arthroplast Today*. 2024 Oct 12;30:101483. DOI: 10.1016/j.artd.2024.101483
30. Buchalter DB, Teo GM, Kirby DJ, Aggarwal VK, Long WJ. Surgical Approach to Total Hip Arthroplasty Affects the Organism Profile of Early Periprosthetic Joint Infections. *JB JS Open Access*. 2020 Nov 25;5(4):e20.00111. DOI: 10.2106/JBJS.OA.20.00111
31. Prast-Nielsen S, Tobin AM, Adamzik K, Powles A, Hugerth LW, Sweeney C, et al. Investigation of the skin microbiome: swabs vs. biopsies. *Br J Dermatol*. 2019 Sep;181(3):572-579. DOI: 10.1111/bjd.17691
32. Boxberger M, Cenizo V, Cassir N, La Scola B. Challenges in exploring and manipulating the human skin microbiome. *Microbiome*. 2021 May 30;9(1):125. DOI: 10.1186/s40168-021-01062-5
33. Luna PC. Skin Microbiome as Years Go By. *Am J Clin Dermatol*. 2020 Sep;21(Suppl 1):12-17. DOI: 10.1007/s40257-020-00549-5
34. Jo J-H, Deming C, Kennedy EA, Conlan S, Polley EC, Ng W-I, et al. Diverse human skin fungal communities in children converge in adulthood. *J Investigative Dermatol*. 2016;136:2356-2363. DOI: 10.1016/j.jid.2016.05.130
35. Leung MHY, Wilkins D, Lee PKH. Insights into the pan-microbiome: skin microbial communities of Chinese individuals differ from other racial groups. *Sci Rep*. 2015;5:11845. DOI: 10.1038/srep11845
36. Prohic A, Simic D, Sadikovic TJ, Krupalija-Fazlic M. Distribution of *Malassezia* species on healthy human skin in Bosnia and Herzegovina: correlation with body part, age and gender. *Iran J Microbiol*. 2014;6:253-262.
37. Oh J, Conlan S, Polley EC, Segre JA, Kong HH. Shifts in human skin and nares microbiota of healthy children and adults. *Genom Med*. 2012;4:77. DOI: 10.1186/gm378
38. Callewaert C, Kerckhof F-M, Granitsiotis MS, Van Gele M, Van de Wiele T, Boon N. Characterization of *Staphylococcus* and *Corynebacterium* clusters in the human axillary region. van Schaik W, editor. *PLoS ONE*. 2013;8:e70538. DOI: 10.1371/journal.pone.0070538
39. Li M, Budding AE, van der Lugt-Degen M, Du-Thumm L, Vandeven M, Fan A. The influence of age, gender and race/ethnicity on the composition of the human axillary microbiome. *Int J Cosmetic Sci*. 2019;41(4):371-7. DOI: 10.1111/ics.12549
40. Wang Y, Yu Q, Zhou R, Feng T, Hilal MG, Li H. Nationality and body location alter human skin microbiome. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021 Jun;105(12):5241-5256. DOI: 10.1007/s00253-021-11387-8
41. Oh J, Byrd AL, Park M. NISC Comparative Sequencing Program, Kong HH, Segre JA. Temporal stability of the human skin microbiome. *Cell*. 2016;165:854-866. DOI: 10.1016/j.cell.2016.04.008
42. Li Z, Bai X, Peng T, Yi X, Luo L, Yang J, et al. New Insights Into the Skin Microbial Communities and Skin Aging. *Front Microbiol*. 2020 Oct 26;11:565549. DOI: 10.3389/fmicb.2020.565549
43. Woo YR, Kim HS. Interaction between the microbiota and the skin barrier in aging skin: a comprehensive review. *Front Physiol*. 2024 Jan 19;15:1322205. DOI: 10.3389/fphys.2024.1322205
44. Howard B, Bascom CC, Hu P, Binder RL, Fadayeel G, Huggins TG, et al. Aging-Associated Changes in the Adult Human Skin Microbiome and the Host Factors that Affect Skin Microbiome Composition. *J Invest Dermatol*. 2022 Jul;142(7):1934-1946.e21. DOI: 10.1016/j.jid.2021.11.029
45. Zhai W, Huang Y, Zhang X, Fei W, Chang Y, Cheng S, et al. Profile of the skin microbiota in a healthy Chinese population. *J Dermatol*. 2018 Nov;45(11):1289-1300. DOI: 10.1111/1346-8138.14594
46. Dimitriu PA, Iker B, Malik K, Leung H, Mohn WW, Hillebrand GG. New Insights into the Intrinsic and Extrinsic Factors That Shape the Human Skin Microbiome. *mBio*. 2019 Jul 2;10(4):e00839-19. DOI: 10.1128/mBio.00839-19
47. Šuler Baglama Š, Trčko K. Skin and gut microbiota dysbiosis in autoimmune and inflammatory skin diseases. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2022 Sep;31(3):105-109.
48. Muszer M, Noszczyńska M, Kasperkiewicz K, Skurnik M. Human Microbiome: When a Friend Becomes an Enemy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2015 Aug;63(4):287-98. DOI: 10.1007/s00005-015-0332-3
49. Mazur M, Tomczak H, Lodyga M, Czajkowski R, Żaba R, Adamski Z. The microbiome of the human skin and its variability in psoriasis and atopic dermatitis.

- Postepy Dermatol Alergol. 2021 Apr;38(2):205-209. DOI: 10.5114/ada.2021.106197
50. Leonel C, Sena IFG, Silva WN, Prazeres PHDM, Fernandes GR, Mancha Agresti P, et al. *Staphylococcus epidermidis* role in the skin microenvironment. J Cell Mol Med. 2019;23:5949-5955. DOI: 10.1111/jcmm.14415
51. Canesso MC, Vieira AT, Castro TB, Schirmer BG, Cisalpino D, Martins FS, et al. Skin wound healing is accelerated and scarless in the absence of commensal microbiota. J Immunol. 2014 Nov 15;193(10):5171-80. DOI: 10.4049/jimmunol.1400625
52. Linehan JL, Harrison OJ, Han S-J, Byrd AL, Vujkovic-Cvijin I, Villarino AV, et al. Non-classical immunity controls microbiota impact on skin immunity and tissue repair. Cell. 2018;172:784-796. DOI: 10.1016/j.cell.2017.12.033
53. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin Microbiol Rev. 2015 Jul;28(3):603-61. DOI: 10.1128/CMR.00134-14
54. Romano-Bertrand S, Bourdier A, Aujoulat F, Michon AL, Masnou A, Parer S, et al. Skin microbiota is the main reservoir of *Roseomonas mucosa*, an emerging opportunistic pathogen so far assumed to be environmental. Clin Microbiol Infect. 2016 Aug;22(8):737.e1-7. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.05.024
55. Serra R, Grande R, Butrico L, Rossi A, Settimio UF, Caroleo B, et al. Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Expert Rev Anti Infect Ther. 2015 May;13(5):605-13. DOI: 10.1586/14787210.2015.1023291
56. Malone M, Johani K, Jensen SO, Gosbell IB, Dickson HG, Hu H, et al. Next Generation DNA Sequencing of Tissues from Infected Diabetic Foot Ulcers. EBioMedicine. 2017 Jul;21:142-149. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.06.026
57. Stone J, Bianco A, Monro J, Overbey JR, Cadet J, Choi KH, et al. Study To Reduce Infection Prior to Elective Cesarean Deliveries (STRIPES): a randomized clinical trial of chlorhexidine. Am J Obstet Gynecol. 2020 Jul;223(1):113.e1-113.e11. DOI: 10.1016/j.ajog.2020.05.021
58. Захарова ИН, Касьянова АН. Микробиом кожи: что нам известно сегодня? Медицинский совет. 2019;17:168-76. / Zakharova IN, Kas'yanova AN. Skin microbiome: What is known today? Medical Council. 2019;17:168-76. DOI: 10.21518/2079-701X-2019-17-168-176 (In Russian).
59. Prieto-Borja L, Pérez-Tanoira R, Levano-Linares DC, Celdrán A, Mahillo-Fernández I, Esteban J. Sonication of Abdominal Drains: Clinical Implications of Quantitative Cultures for the Diagnosis of Surgical Site Infection. Surg Infect (Larchmt). 2016 Aug;17(4):459-64. DOI: 10.1089/sur.2015.268
60. Hadian Y, Fregoso D, Nguyen C, Bagoood MD, Dahle SE, Gareau MG, et al. Microbiome-skin-brain axis: A novel paradigm for cutaneous wounds. Wound Repair Regen. 2020 May;28(3):282-292. DOI: 10.1111/wrr.12800
61. De Pessemier B, Grine L, Debaere M, Maes A, Paetzold B, Callewaert C. Gut-Skin Axis: Current Knowledge of the Interrelationship between Microbial Dysbiosis and Skin Conditions. Microorganisms. 2021 Feb 11;9(2):353. DOI: 10.3390/microorganisms9020353
62. Salem I, Ramser A, Isham N, Ghannoum MA. The gut microbiome as a major regulator of the gut-skin axis. Front Microbiol. 2018;9:1459. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01459
63. Szántó M, Dózsa A, Antal D, Szabó K, Kemény L, Bai P. Targeting the gut-skin axis-Probiotics as new tools for skin disorder management? Exp Dermatol. 2019;28:1210-1218. DOI: 10.1111/exd.14016
64. Chunxi L, Haiyue L, Yanxia L, Jianbing P, Jin S. The Gut Microbiota and Respiratory Diseases: New Evidence. J Immunol Res. 2020 Jul 31;2020:2340670. DOI: 10.1155/2020/2340670
65. Yan D, Issa N, Afifi L, Jeon C, Chang HW, Liao W. The Role of the Skin and Gut Microbiome in Psoriatic Disease. Curr Dermatol Rep. 2017 Jun;6(2):94-103. DOI: 10.1007/s13671-017-0178-5
66. Zhang X, Shi L, Sun T, Guo K, Geng S. Dysbiosis of gut microbiota and its correlation with dysregulation of cytokines in psoriasis patients. BMC Microbiol. 2021;21:78. DOI: 10.1186/s12866-021-02125-1

Информация о соавторах:

Сергеев Алексей Николаевич, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой общей хирургии Тверского государственного медицинского университета; врач-хирург Городской клинической больницы №7 Министерства здравоохранения Тверской области
ORCID: 0000-0002-9657-8063

Червинец Юлия Вячеславовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии Тверского государственного медицинского университета
ORCID: 0000-0001-9209-7839

Пискарева Мария Евгеньевна, студентка
Тверского государственного медицинского университета
ORCID: 0000-0002-4329-2539

Information about co-authors:

Alexey N. Sergeev, MD, PhD, DSc, Associate Professor, Head of the Department of General Surgery Tver State Medical University; Surgeon at Municipal Clinical Hospital No 7, Ministry of Health of the Tver Region
ORCID: 0000-0002-9657-8063

Yulia V. Chervinets, MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Microbiology and Virology with a course in Immunology, Tver State Medical University
ORCID: 0000-0001-9209-7839

Maria E. Piskareva, student of Tver State Medical University
ORCID: 0000-0002-4329-2539

Транскриптомный анализ для изучения механизмов антибиотикорезистентности и вирулентности *Klebsiella pneumoniae*

А.Е.Соломенцева¹, С.В.Губанов², М.В.Фурсов¹, Н.К.Фурсова¹

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

²ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского», Саратов, Российская Федерация

Бактерии *Klebsiella pneumoniae* являются одним из основных возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Клиническая значимость клебсиелл усугубляется тенденцией распространения антибиотикоустойчивости ко всем классам потенциально активных препаратов, в т.ч. карбапенемам. Кроме того, распространяются штаммы, характеризующиеся не только множественной лекарственной устойчивостью, но и гипервирулентностью, что представляет особую проблему для здравоохранения. Несмотря на значительные достижения в изучении резистентности и вирулентности *K. pneumoniae*, транскриптомные исследования представляют собой перспективное направление.

Настоящий обзор посвящен описанию генезиса и распространения конвергентных линий *K. pneumoniae*, характеристике их резистомов и вируломонов и изучению изменения экспрессии детерминант антибиотикорезистентности и вирулентности методами транскриптомики.

Ключевые слова: транскриптом, вирулентность, мнРНК, антибиотикорезистентность, карбапенем-устойчивые гипервирулентные *Klebsiella pneumoniae*

Для цитирования: Соломенцева А.Е., Губанов С.В., Фурсов М.В., Фурсова Н.К. Транскриптомный анализ для изучения механизмов антибиотикорезистентности и вирулентности *Klebsiella pneumoniae*. Бактериология. 2025; 10(3): 90–100. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-90-100

Transcriptome analysis to study the mechanisms of antibiotic resistance and virulence of *Klebsiella pneumoniae*

A.E.Solomentseva¹, S.V.Gubanov², M.V.Fursov¹, N.K.Fursova¹

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

²N.G.Chernyshevsky Saratov National Research State University, Saratov, Russian Federation

Klebsiella pneumoniae is one of the main causative agents of infections associated with medical care. The clinical significance of *Klebsiella* is reinforced by the trend of spreading antibiotic resistance to all classes of potentially active drugs, including carbapenems. In addition, *K. pneumoniae* strains characterized not only by multidrug resistance, but also by hypervirulence are spreading, which is a particular problem for public health. Despite significant advances in the study of resistance and virulence of *K. pneumoniae*, transcriptomic research is a promising area.

This review is devoted to the description of the genesis and distribution of convergent lineages of *K. pneumoniae*, the characterization of their resistomes and virulomes, and the study of changes in the expression of antibiotic resistance and virulence determinants using transcriptomics methods.

Key words: transcriptome, virulence, carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, antibiotic resistance, small RNA

For citation: Solomentseva A.E., Gubanov S.V., Fursov M.V., Fursova N.K. Transcriptome analysis to study the mechanisms of antibiotic resistance and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. Bacteriology. 2025; 10(3): 90–100. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-90-100

Для корреспонденции:

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

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0000

Статья поступила 02.07.2025, принята к печати 30.09.2025

For correspondence:

Aleksandra E. Solomentseva, Junior Researcher of Culture Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0000

The article was received 02.07.2025, accepted for publication 30.09.2025

Klebsiella pneumoniae – патоген человека, а инфекции, вызванные антибиотикорезистентными штаммами клебсиелл, сопровождаются высокой смертностью пациентов [1].

Гипервирулентность и устойчивость к антибиотикам – два основных направления эволюции *K. pneumoniae*. К классической эволюционной линии клебсиелл (сКр) принадлежат *K. pneumoniae*, вызывающие инфекции в основном в больницах и учреждениях длительного ухода и обладающие ярко выраженной способностью приобретать множественные генетические детерминанты антибиотикорезистентности [2]. С 1980-х гг. все большую клиническую значимость приобретают *K. pneumoniae* гипервирулентного варианта (hvКр), способные поражать здоровых людей [2]. Долгое время множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) и гипервирулентность считались двумя непересекающимися фенотипами, поскольку штаммы сКр гораздо менее вирулентны, а штаммы hvКр обычно чувствительны к антибиотикам. Однако в последние десятилетия наблюдается распространение штаммов, принадлежащих к конвергентной эволюционной линии. Гибридные штаммы MDR-hvКр (гипервирулентные *K. pneumoniae*, обладающие МЛУ) объединяют патогенетический потенциал гипервирулентных hvКр и высокий уровень лекарственной устойчивости штаммов сКр, что является результатом множественных механизмов, включающих в себя горизонтальный перенос плазмид с генетическими детерминантами антибиотикорезистентности и/или гипервирулентности между штаммами. Пациенты, инфицированные MDR-hvКр, часто имеют риск увеличения сроков госпитализации, терапевтической неэффективности, неблагоприятного исхода заболевания [3]. Все это ставит вопрос о подходах к терапии инфекций, вызванных *K. pneumoniae*, так как распространение гибридных штаммов приводит к повышению заболеваемости и смертности и ограничивает терапевтический потенциал клиницистов [3].

Для поиска новых мишеней, которые могут быть использованы при разработке современных подходов к терапии инфекций, вызванных гибридными штаммами *K. pneumoniae*, необходимо изучить молекулярные механизмы противодействия клеток и популяций патогена в ответ на воздействие используемых в клинической практике лекарственных препаратов. Одним из перспективных направлений является изучение транскрипционного ответа бактериальных клеток на присутствие в окружающей среде антибиотиков, а также выявление возможной роли малых некодирующих РНК (мнРНК) в регуляции ответа на стрессовые воздействия [4].

Настоящий обзор посвящен описанию генезиса и распространения конвергентных линий *K. pneumoniae*, характеристике их резистомов и вируломов и изучению изменения экспрессии детерминант антибиотикорезистентности и вирулентности методами транскриптомики.

Современные эволюционные линии *Klebsiella pneumoniae*

В настоящее время в разных регионах мира фиксируются клебсиеллезные инфекции, вызванные как сКр-, так и hvКр-штаммами [5, 6]. Штаммы из группы сКр характеризуются невысоким уровнем вирулентности, кластеризуются в сотни различных сиквенс-типов (ST) и капсульных типов [7].

Распространение карбапенем-устойчивых *K. pneumoniae* (CR-Кр) представляет собой угрозу для здравоохранения во всем мире из-за высокого уровня смертности от вызываемых ими инфекций. Например, на долю CR-Кр приходится >90 тыс. инфекций и >7 тыс. смертей в год в Европе [1]. Высокая смертность, связанная с CR-Кр, объясняется повышенной выживаемостью этих патогенов в макроорганизме во время лечения антибиотиками, что приводит к цитокиновому шторму и последующей смерти [8].

Для штаммов hvКр характерна чувствительность к антибиотикам, за исключением ампициллина, и высокий уровень вирулентности [7]. Первый случай инфекции, вызванной штаммом hvКр, был описан в 1986 г. на Тайване – абсцесс печени с метастатическим распространением [9]. Данный патотип стал превалировать в Азиатско-Тихоокеанском регионе, постепенно распространяясь по всему миру [10].

Гипервирулентность *K. pneumoniae* ассоциирована с гипермукоидным фенотипом и продукцией сидерофоров – иерсиниабактина, салмохелина и/или аэробактина [2]. Гипермукоидная капсула, синтез которой контролируется регуляторами мукоидности *rmpADC* и *rmpA2*, обеспечивает устойчивость бактерий к иммунной системе макроорганизма за счет подавления фагоцитоза, опсонизации и комплемент-опосредованного киллинга [7]. В лабораторных условиях гипермукоидность определяется как положительный результат стринг-теста при образовании вязкой нити длиной >5 мм при растяжении бактериологической петлей колонии *K. pneumoniae*, сформированной на чашке с агаром. Таким образом, исторически штаммы hvКр идентифицировали с помощью стринг-теста, а гипермукоидность служила маркером гипервирулентности [6].

Сидерофоры – низкомолекулярные вещества различной природы, хелатирующие ионы Fe^{3+} . К ним относятся энтеробактин (Ent), аэробактин (Iuc), салмохелин (Iro) и иерсиниабактин (Ybt). Энтеробактин встречается не только у hvКр, но и у сКр. В течение длительного времени штаммы hvКр редко проявляли устойчивость к широко используемым антимикробным препаратам (АМП), что может быть связано с наличием у них систем, ограничивающих горизонтальный перенос генов, – рестрикции-модификации и CRISPR-Cas (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) [11].

На данный момент четкая общепринятая дифференциация между hvКр и сКр отсутствует. Некоторые исследователи определяют hvКр по наличию генов *iuc*, другие предлагают оценивать наличие пяти генов (*rmpA*, *rmpA2*, *peg-344*, *iucA* и *iroB*) [2, 10], третьи основываются на результатах использования мышиной модели как золотого стандарта идентификации hvКр-штаммов, имеющих $LD_{50} < 100$ КОЕ, по сравнению со штаммами сКр с $LD_{50} > 10^7$ – 10^9 КОЕ [12].

В последнее десятилетие появились и активно распространяются гибридные штаммы *K. pneumoniae*, имеющие характеристики одновременно hvКр и MDR-сКр. Такие штаммы вызывают у здоровых людей инвазивные и диссеминированные инфекции, трудно поддающиеся лечению. Клинические проявления MDR-hvКр-инфекций сложны и разнообразны, поскольку они объединяют симптомы, вызываемые внегоспитальными hvКр и госпитальными сКр [3]. Зачастую они представлены в виде тяжелых внутрибольнич-

ных и внебольничных инфекций с высоким уровнем летальности, проявляющихся в виде множественных инфекций, включая менингит и эпидуральный абсцесс, эндофтальмит, пневмонию, bacterиeмию, абсцесс печени, некротическую инфекцию кожи и мягких тканей, а также инфекцию костей (рис. 1) [3].

Показано, что гибридные штаммы *K. pneumoniae* могут формироваться тремя независимыми путями: 1) приобретение hvKP-штаммом плазмид антибиотикорезистентности [13]; 2) получение MDR-сКр-штаммом неконъюгативной pLVPK-плазмиды вирулентности с помощью хелперной конъюгативной плазмиды [14]; 3) получение MDR-сКр-штаммом гибридной плазмиды вирулентности, одновременно несущей гены устойчивости к карбапенемам и гены гипервирулентности (рис. 2) [15].

Наличие мощной капсулы у hvKp приводит к ограничению у них горизонтального переноса генов, что объясняет более низкий уровень гетерогенности плазмид и геномного разнообразия в целом у hvKP, в результате чего клональное разнообразие гибридных клонов на основе hvKp оказывается существенно меньшим по сравнению с таковыми на основе сКр [16]. Отмечается, что гибридные штаммы характеризуются сниженной вирулентностью по сравнению с hvKp-штаммами [17]. На настоящий момент механизмы регуляции вирулентности и антибиотикорезистентности у гибридных штаммов клебсиелл изучены недостаточно.

Механизмы устойчивости к β -лактамам у MDR-hvKp-штаммов и их регуляция

Устойчивость *K. pneumoniae* к β -лактамам связана с продукцией β -лактамаз узкого, широкого и расширенного спектра, в т.ч. пенициллиназ, цефалоспоринов и карбапенемаз, локализованных как на хромосоме, так и на плазмидах [7]. Однако повсеместно выделяются штаммы, устойчивые к антибиотикам, но не несущие генов β -лактамаз, что обусловлено наличием мутаций в генах поринов мембраны и эффлюксных насосов (табл. 1) [18, 19].

Продукция ферментов β -лактамаз

Распространение устойчивости к β -лактамам у *K. pneumoniae* в первую очередь связано как с меж-, так и внутривидовым обменом ДНК, особенно посредством горизонтального переноса генов резистентности, расположенных на плазмидах. Эти плазмиды могут обеспечить устойчивость к широкому спектру АМП, включая β -лактамы, аминогликозиды, хлорамфеникол, макролиды, сульфаниламиды, триметоприм, тетрациклины и хинолоны [20].

Особую обеспокоенность вызывает распространение генов карбапенемаз. Штаммы CR-Kp стали угрозой в клинических условиях из-за распространения устойчивых к антибиотикам фенотипов и глобального распространения через мобильные генетические элементы, вызывая гораздо более высокую смертность, чем чувствительные к карбапенемам *K. pneumoniae* [8]. Согласно классификации Ambler, карбапенемазы можно разделить на несколько классов. Карбапенемазы класса А (например, KPC-типа, VKC-1) способны гидролизовать почти все β -лактаменные антибиотики. К карбапенемазам класса В относятся металло- β -лактамазы (MBL), характеризующиеся наличием одного или двух ионов

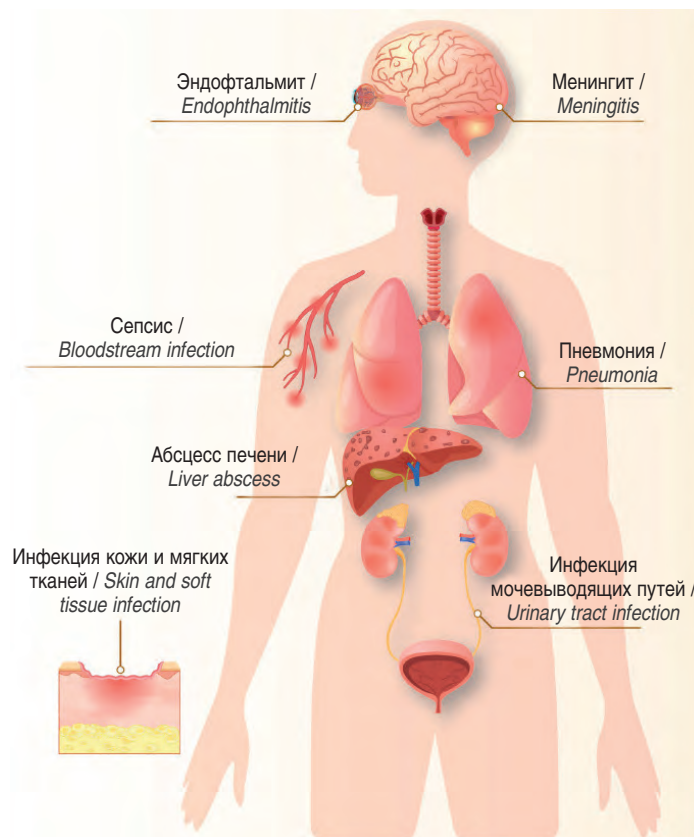


Рис. 1. Клинические формы клебсиеллезной инфекции, вызванной штаммами CR-hvKp [3, с изменениями].

Fig. 1. Clinical forms of *Klebsiella* infection caused by CR-hvKp strains [3, with changes].

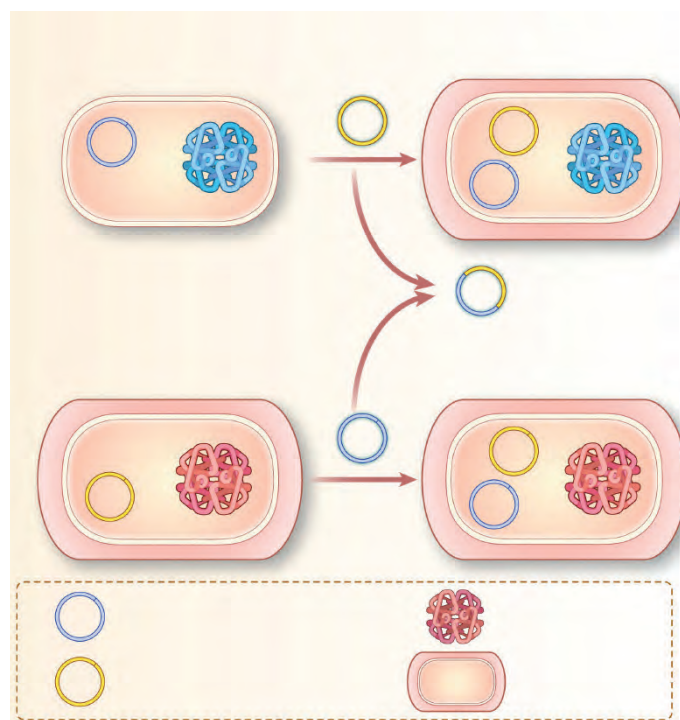


Рис. 2. Пути формирования конвергентной линии карбапенем-резистентных штаммов *K. pneumoniae* (CR-hvKp) на основе штаммов hvKp и CR-Kp [3, с изменениями].

Fig. 2. Ways of formation of convergent carbapenem-resistant strains of *K. pneumoniae* (CR-hvKp) based on hvKp and CR-Kp strains [3, with modifications].

Таблица 1. Механизмы устойчивости к β-лактамам у MDR-hvKp штаммов (приведена классификация β-лактамаз по Ambler)
 Table 1. Mechanisms of β-lactam resistance in MDR-hvKp strains (Ambler classification of β-lactamases is given)

Продукция ферментов / Enzyme production	β-лактамазы / β-lactamases	A	Сериновые β-лактамазы / <i>serine β-lactamases</i> (KPC, ESBLs, TEM-1, SHV-1, CTX-M, β-лактамазы, устойчивые к действию ингибиторов / <i>β-lactamases resistant to inhibitors</i>) Гидролизуют пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и азтреонам / <i>Hydrolyze penicillins, cephalosporins, carbapenems and aztreonam</i>
		B	Металло-β-лактамазы / <i>metallo-β-lactamases</i> (NDM, VIM, IMP) Гидролизуют пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы, но не азтреонам / <i>Hydrolyze penicillins, cephalosporins, carbapenems, but not aztreonam</i>
		C	Сериновые р-лактамазы / <i>serine β-lactamases</i> цефалоспориноаза / <i>cephalosporinase</i> AmpC Устойчивость к цефамицинам и цефалоспоринов третьего поколения / <i>Resistance to cephamycins and third-generation cephalosporins</i>
		D	Сериновые β-лактамазы / <i>serine β-lactamases</i> (OXA-48-подобные) / <i>similar</i> Гидролизуют карбапенемы, нет активности в отношении цефалоспоринов расширенного спектра действия / <i>Hydrolyzes carbapenems, no activity against extended-spectrum cephalosporins</i>
Генетические мутации / Gene mutations	Эффлюксные насосы / Efflux pumps	AcrAB, CpxAR, OqxAB, EefAB, AcrD, MdtABC, KexD, MacAB, KpnEF, KdeA, EmrAB	
	Порины мембраны / Membrane porins	OmpK35, OmpK36	

Таблица 2. Молекулярная классификация ферментов карбапенемаз [21]
 Table 2. Molecular classification of carbapenemase enzymes [21]

Класс A / Class A	Хромосомно-кодируемые ферменты / Chromosome encoded enzymes	SME (<i>Serratia marcescens</i> enzyme, SME-1 - SME-6); IMI-1 (Imipenem-гидролизующая β-лактамаза); SFC-1 (<i>Serratia fonticola</i> carbapenemase-1)
	Плазмидо-кодируемые ферменты / Plasmid encoded enzymes	KPC (<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase, KPC-2 – KPC-276); IMI (IMI-1 – IMI-30); GES (<i>Guiana</i> extended spectrum, GES-4, 5, 6, 14, 16, 18, 20, 21, 24, 25, 28, 30, 33, 39, 40, 41, 47, 48, 49, 50, 51, 53, 54, 61, 66)
Класс B / Class B	Металло-β-лактамазы (ингибируются ЭДТА) / Metallo-β-lactamases	NDM (New Delhi metallo-β-lactamase-1, NDM-1 – NDM-88); IMP (Imipenem-resistant <i>Pseudomonas</i> , IMP-1 – IMP-111); VIM (Verona integron-encoded metallo-β-lactamase, VIM-1 – VIM-95); GIM (German imipenemase, GIM-1 – GIM-3); SIM (Seoul imipenemase, SIM-1, SIM-2)
Класс C / Class C	AmpC-тип (эмерджентные) / AmpC-type	ADC-68 (<i>Acinetobacter</i> -derived cephalosporinase)
Класс D / Class D	Оксациллиназы (слабо ингибируются ЭДТА или клавулановой кислотой) / Oxacillinases	OXA (Oxacillin-hydrolyzing carbapenemases, OXA-24-like, OXA-40-like, OXA-48-like, OXA-51-like, OXA-58-like)

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота. / EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid.

цинка в активном центре: Нью-Дели-MBL (NDM-тип), интегрон-кодируемые Верона-MBL в составе (VIM-тип) и имипенемазы-MBL (IMP-тип). MBL гидролизуют почти все β-лактамы антибиотиков, за исключением монобактамов. К карбапенемазам класса D в основном относят оксациллиназу OXA-48 и OXA-181, которые проявляют слабую карбапенемазную активность, но сохраняют способность к гидролизу пенициллинов (табл. 2) [21].

Ферменты класса C не считаются карбапенемазами. Однако было показано, что они обладают низким потенциалом гидролиза карбапенемов, и их избыточная выработка может способствовать развитию устойчивости к карбапенемам в сочетании с пониженной проницаемостью внешней мембраны или избыточной экспрессией насосов для выведения [21].

В Евразийском регионе за период 2015–2022 гг. наиболее часто обнаруживали карбапенемазы классов B и D среди CR-hvKp-штаммов (рис. 3) [22].

Так, например, в Индии, Иране, России и Италии идентифицированы CR-hvKp-штаммы, несущие гены *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM-1} и *bla*_{VIM-1} [5, 23–25]. Описаны штаммы CR-hvKp, продуцирующие ферменты класса A, широко распространенные в Азии и Америке, а в настоящее время и в России [26, 27].

Плазмиды, несущие несколько генов устойчивости к карбапенемам, могут сформироваться в результате рекомбинации и образования гибридных плазмид [28]. Повсеместно отмечаются случаи выделения штаммов CR-hvKp, несущих два и более генов карбапенемаз и вызывающих серьезные инфекционные заболевания с высоким уровнем смертности. Так, в Индии начиная с 2014 г. описаны штаммы, одновременно продуцирующие карбапенемазы NDM и OXA-48 [29, 30]. В 2020 г. в Италии и Иране были также зарегистрированы штаммы CR-hvKp, продуцирующие NDM и OXA-48 [31–33]. В 2022 г. в Египте был обнаружен штамм CR-hvKp, несущий гены *bla*_{KPC-2} и *bla*_{OXA-48} [28]. В 2022 г. в Италии охарактеризован штамм CR-hvKp, несущий гены карбапенемаз

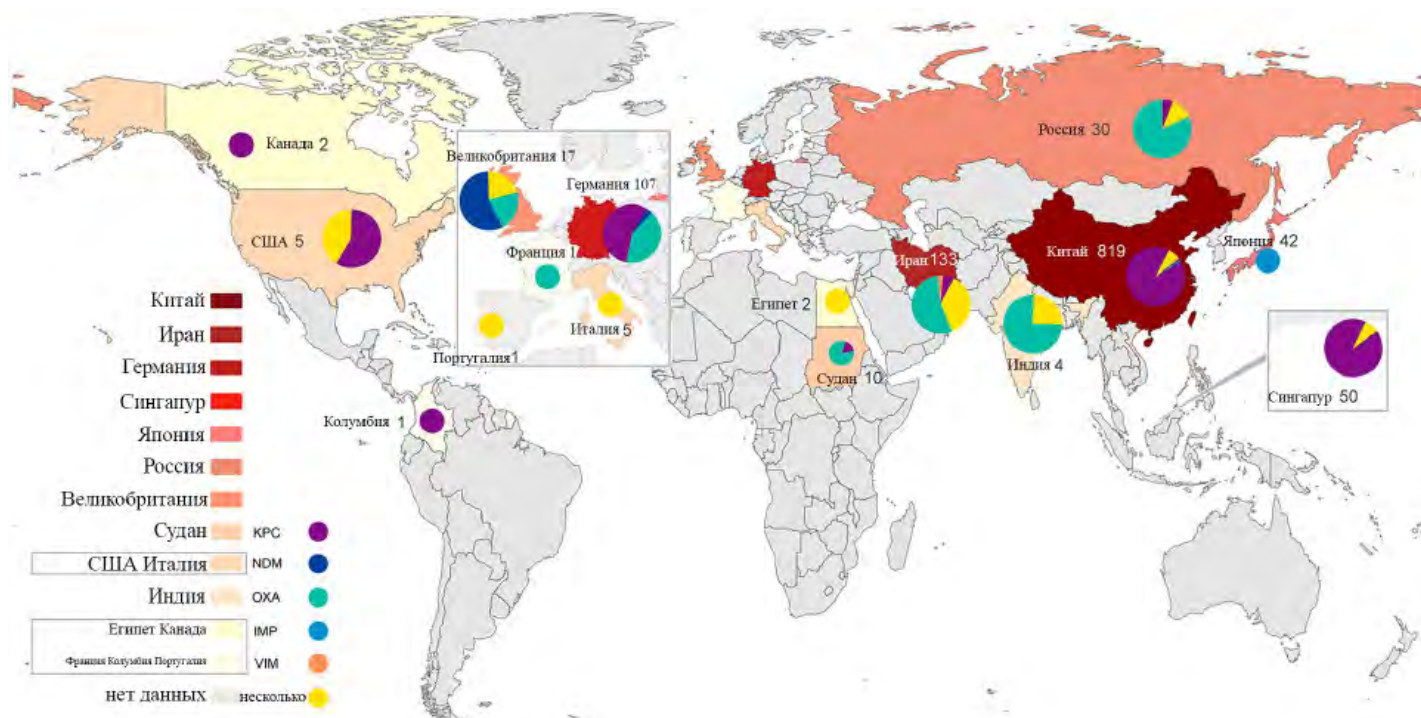


Рис. 3. Распространенность CR-hvKp-штаммов в мире в 2015–2022 гг. Числами обозначено количество выделенных штаммов, принадлежащих к конвергентной линии [22, с изменениями].
 Fig. 3. Prevalence of CR-hvKp strains in the world in 2015–2022. The numbers indicate the number of isolated strains belonging to the convergent lineage [22, with changes].

двух классов (В и D) blaNDM-1, blaNDM-5 и blaOXA-48 [34]. В 2023 г. в России были описаны штаммы CR-hvKP, несущие 3 гена карбапенемаз разных классов (А, В и D) одновременно – bla_{KPC-2}, bla_{NDM-1} и bla_{OXA-48} [35]. CR-hvKp, продуцирующие несколько карбапенемаз, представляют собой новую проблему для инфекционного контроля.

Активация эффлюксных насосов

У *K. pneumoniae* идентифицированы несколько типов эффлюксных насосов, ассоциированных с МЛУ, включая представителей пяти суперсемейств: RND (AcrAB-TolC, OqxAB, EefAB, AcrD, MdtABC и KexD), ABC (MacAB), SMR (KpnEF), MATE (KdeA) и MFS (EmrAB) [36].

Например, повышенная экспрессия представителя суперсемейства RND эффлюксного насоса AcrAB способствует развитию МЛУ [18, 37], а также является одним из механизмов устойчивости грамотрицательных микроорганизмов к карбапенемам [37, 38] и тигециклину [39, 40]. Важную роль в регуляции AcrAB играет транскрипционный регулятор RamA из семейства AraC. Повышенная экспрессия RamA усиливает транскрипцию генов *acrAB* и *tolC*, что приводит к усилению трансляции эффлюксных белков AcrAB-TolC, что в конечном итоге приводит к МЛУ [41]. Интересно, что для повышения вирулентности клебсиелл также необходима система AcrAB. Показано, что мутанты с делецией AcrAB являются менее вирулентными по сравнению со штаммами дикого типа [42–44].

Большую роль в активации эффлюксных насосов суперсемейства RND играет двухкомпонентная система SrxAR, состоящая из сенсорной киназы SrxA и регулятора SrxR, гены которых локализованы на хромосоме. В случае стрессового воздействия на бактериальную мембрану SrxAR

активирует экспрессию генов *acrAB* и *mdtABC*, что обеспечивает фенотип мультирезистентности благодаря эффлюксу широкого спектра АМП. Регулон SrxAR играет важную роль в формировании устойчивости к АМП у клебсиелл. Инактивация SrxAR у *K. pneumoniae* приводит к увеличению чувствительности бактерий к цефепиму и хлорамфениколу [45]. Отмечается влияние бактериальных двухкомпонентных систем на экспрессию генов карбапенемаз. В работе Z.Liu et al. (2023) показано, что SrxAR усиливает экспрессию гена bla_{KPC} на конъюгативной плазмиде IncFII у *K. pneumoniae* ST11 за счет связи SrxR с промоторной областью bla_{KPC}. Также SrxR связывается с промотором *tra* оперона и активирует конъюгацию плазмиды, устойчивой к карбапенемам [46].

Снижение экспрессии или утрата поринов

Порины внешней мембраны – неспецифические каналы диффузии, которые обеспечивают проникновение внутрь клетки *K. pneumoniae* питательных веществ и других гидрофильных молекул, таких как β-лактамы, размер которых составляет от 300 до 550 Да. Мутации в генах поринов (точечные мутации или инсерции IS-элементов) приводят к уменьшению диаметра пор или к их полной утрате на поверхности бактериальной клетки, что является механизмом антибиотикоустойчивости [19].

OmpK36 – мажорный порин *K. pneumoniae*, относящийся к семейству OmpC; клебсиеллы имеют также порин OmpK35, принадлежащий к семейству OmpF [19]. Снижение экспрессии OmpK35 и OmpK36 является одним из описанных механизмов устойчивости к цефокситину, оксиминоцефалоспорином, карбапенемам, монобактамам и фторхинолонам у ESBL- и AmpC-продуцирующих клебсиелл [47].

Вирулентность *Klebsiella pneumoniae*

Вирулентность штаммов *K. pneumoniae* определяется наличием следующих факторов патогенности:

- полисахаридная капсула, которая препятствует фагоцитозу нейтрофилами и инактивации при помощи системы комплемента [2];
- липополисахарид (LPS), эндотоксин, который защищает бактерию от фагоцитоза и вызывает воспалительную реакцию в макроорганизме [7];
- фимбрии I и III типа, обеспечивающие адгезию бактерий на клетках организма-хозяина [6];
- сидерофоры, или системы поглощения железа [2].

Многие исследования демонстрируют, что два гена-регулятора мукоидного фенотипа *rmpA* и *rmpA2* на плазмиде вирулентности являются hvKP-специфическими факторами вирулентности [2]. Исследование M.Jiang (2024), направленное на изучение молекулярных характеристик и экспрессии генов вирулентности у карбапенем-чувствительных и карбапенем-устойчивых штаммов *K. pneumoniae*, показало, что относительная экспрессия генов вирулентности отличалась у разных штаммов; наиболее статистически значимая разница наблюдалась в экспрессии генов *rmpA* и *rmpA2*. На модели личинок *Galleria mellonella* установлено, что выживаемость особей зависела от присутствия в заражающих штаммах *K. pneumoniae* генов *rmpA*, *rmpA2* и *iutA*: статистически значимо данный показатель был ниже при использовании данных штаммов, по сравнению с таковым при использовании штаммов, не несущих гены *rmpA*, *rmpA2* и *iutA* [48].

Одним из основных факторов, способствующих гипермуковязкости, был признан повышенный уровень продукции RmpD. Скрининг 33 регуляторов подтвердил, что для проявления гипермуковязкости и вирулентности *K. pneumoniae* на модели пневмонии у мышей необходим регулятор OmpR, утрата которого приводила к сверхэкспрессии АТФ-синтазы F-типа и системы расщепления глицина, что изменяло энергетический статус клеток и способствовало последующему снижению их мукоидности. Транскриптомный анализ показал, что отсутствие OmpR привело к изменениям в экспрессии большого числа генов *K. pneumoniae*. Наиболее дифференциально активированными были гены, отвечающие за биосинтез АТФ и метаболизм серина. Это новое понимание связи между OmpR-опосредованным бактериальным энергетическим метаболизмом и гипермукоидностью улучшает наше понимание сложной взаимосвязи между бактериальным метаболизмом и муковязкостью [49].

Биопленки

Образование биопленок является важным признаком вирулентности *K. pneumoniae*. Наряду с ограничениями терапевтических возможностей при инфекциях, вызванных CR-Kp-штаммами, образование биопленок рассматривается как дополнительный фактор риска, связанный с экспрессией карбапенемаз, имеющий жизненно важное значение. Биопленки – это организованное сообщество бактериальных клеток, окруженных внеклеточным матриксом, которое формируется за счет прикрепления к биотическим или абиотическим поверхностям [7]. Внеклеточный матрикс защищает бактериальные клетки от внешних воздействий, в т.ч.

от других бактерий и антимикробных препаратов. Одним из свойств биопленок является способность противостоять иммунной системе макроорганизма за счет устойчивости к фагоцитарной системе, опсонизации и др. [7].

Биопленки играют важную роль в развитии бактериальной инфекции и лекарственной устойчивости. Продемонстрирована корреляция между устойчивостью к антибиотикам у *K. pneumoniae* и способностью к образованию биопленок; *K. pneumoniae* с МЛУ, включая CR-Kp, в большей степени способны к образованию биопленок, чем чувствительные формы [50, 51]; при этом устойчивость к антибиотикам у *K. pneumoniae* в состоянии биопленки увеличена по сравнению с планктонными клетками в 10–1000 раз [52].

Молекулярно-генетические исследования показали, что на стадии созревания биопленок *K. pneumoniae* (24 ч) активно экспрессируются гены регулятора биопленкообразования *bssS* и фимбрий III типа *fimH*, что тесно связано с фенотипическим развитием биопленки. Отмеченная способность к метастазированию очагов инфекции CR-Kp связана с дисперсией биопленок и колонизацией вторичных очагов инфекции, что подтверждает роль биопленок как фактора патогенности [53].

Особенности транскриптома CR-hvKp

Анализ современной литературы показывает, что пока опубликовано незначительное количество работ, посвященных изучению особенностей экспрессии генов вирулентности и антибиотикорезистентности в клетках гибридных *K. pneumoniae*. Тем не менее этот вопрос представляет большой интерес с точки зрения как фундаментальных механизмов, так и практической значимости для медицины. Наибольший интерес представляет транскриптомный ответ гибридных штаммов CR-hvKp на присутствие антибиотиков в окружающей среде, поскольку это непосредственно связано с выбором адекватной терапии, особенно в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Выбор карбапенемов в качестве эмпирической терапии без идентификации патотипа возбудителя может привести к непредсказуемому увеличению экспрессии дополнительных факторов патогенности, что может усугубить состояние пациента и увеличить риск неблагоприятного исхода (рис. 4).

Бактерии реагируют на состояние окружающей среды, изменяя транскрипцию своих генов. Для выявления регуляторных механизмов данных процессов используют метод РНК-секвенирования с дальнейшим транскриптомным ана-



Рис. 4. Временная шкала коррекции антибиотикотерапии в отделениях реанимации и интенсивной терапии.
 Fig. 4. Timeline of correction of antibiotic therapy in intensive care units and intensive care units.

лизом. Так, например, было показано, что при изменении температуры культивирования штаммов *K. pneumoniae* с 37 до 15°C изменялась транскрипция корового генома в ответ температурный стресс, в частности отмечено снижение транскрипции генов синтеза и транспорта энтеробактина, одного из факторов патогенности энтеробактерий [54]. С помощью РНК-секвенирования и микроскопии показано, что воздействие на культуры *K. pneumoniae* возрастающих концентраций колистина приводило к образованию устойчивых форм патогена и параллельно к транскрипционным изменениям в основных клеточных функциях, которые коррелировали с морфологическими изменениями самих клеток. В присутствии колистина у устойчивых к колистину клеток *K. pneumoniae* зафиксирована повышенная экспрессия генов, ассоциированных с вирулентностью: оперона *arnA-T*, участвующего в модификации липида А, генов двухкомпонентного сенсора *crrAB* (ранее *TCRS*), гликозилтрансферазы, эффлюксного насоса *AcrAB* и четырех эффлюксных систем суперсемейства RND. Напротив, гены, кодирующие порыны *OmpA* и *OmpC*, которые обеспечивают пассивное поглощение антибиотиков, показали сниженные уровни экспрессии [55]. Идентификация роли дополнительной регуляторной системы *crrAB* при формировании устойчивости к колистину расширяет спектр идентифицированных генетических детерминант, которые модулируют этот фенотип, и подчеркивает многообразие способов, которыми клетки реагируют на воздействие антимикробных пептидов [56]. Показано, что окружающая среда, в т.ч. селективное давление антибиотиков, может стимулировать изменения не только чувствительности к антибиотикам, но и уровня вирулентности штаммов *K. pneumoniae*. Подчеркивается, что полиморфизм вирулентности штаммов *K. pneumoniae* может быть ассоциирован с общим состоянием пациента, окружающими условиями селективным давлением антибиотиков [57].

Формирование конвергентных линий CR-hvKp происходит в несколько этапов, поскольку приобретение дополнительного генетического материала, плазмид антибиотикорезистентности, сначала приводит к нарушению метаболического баланса и снижению вирулентных свойств. Например, при трансформации гипервирулентного штамма плазмидой резистентности p24835-NDM5 наблюдалось снижение вирулентности штамма за счет снижения экспрессии генов синтеза капсулы *yadA* и *iutA* и увеличению чувствительности к сыворотке крови организма-хозяина. Одновременно гибридный штамм продолжал сохранять высокий уровень устойчивости к фагоцитозу, опосредованному нейтрофилами, и высокий уровень летальности на мышинной модели [58].

Стоит отметить важную роль мембранного белка TolC, необходимого для функционирования трехкомпонентных систем, играющего плейотропную роль в биологии *K. pneumoniae*: способствующего резистентности к АМП, важного для гомеостаза железа в клетке и для проявления вирулентности. Делеция *tolC* приводила к уменьшению образования капсул, что подтверждалось снижением гипермукоидности в стринг-тесте и увеличением скорости осаждения в тесте на гипермуковязкость, снижению продукции урсоловой кислоты, повышению адгезии к энтероцитам человека, повышению чувствительности к сыворотке крови и снижению вирулентности на модели личинок *G. mellonella*. На

молекулярном уровне плейотропный эффект TolC связан с тем, что субстратами TolC-зависимых переносчиков являются молекулы цГМФ, играющие важную роль в кворуме бактерий, с его ролью в гомеостазе железа, в т.ч. влиянии на активность регулятора поглощения железа Fur, который регулирует биосинтез капсулы [59].

Другим важным метаболическим регулятором является RamA – глобальный регулятор транскрипции, связанный с устойчивостью к большому числу лекарственных препаратов и другим токсичным молекулам, а также гипервирулентностью. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что *ramA* непосредственно активирует *AcrAB* и локусы, участвующие в ремоделировании липида А [60].

В исследовании 2023 г. S.Park et al. изучали механизмы, которые связывают устойчивость к тигециклину со снижением вирулентности штаммов *K. pneumoniae*. У устойчивых к тигециклину штаммов *K. pneumoniae* выявлено снижение экспрессии порына OmpK35 по сравнению с чувствительными изолятами. Кроме того, развитие резистентности к тигециклину у гипервирулентных *K. pneumoniae* приводило к снижению вирулентности, связанному с редукцией капсулы. Транскриптомный анализ показал, что тигециклин-резистентные мутантные штаммы сверхэкспрессировали *ompR*, который негативно регулирует экспрессию *ompK35*, в то время как делеция *ompR* приводила к восстановлению их гипермукоидности и вирулентности [61]. Данный механизм может рассматриваться как возможный компенсаторный механизм в эволюции стабильных конвергентных линий *K. pneumoniae*, объединяющих свойства устойчивости и гипервирулентности.

Роль мРНК в регуляции антибиотикоустойчивости и вирулентности *K. pneumoniae*

мРНК являются посттранскрипционными регуляторами генов, участвующих в важных биологических процессах у бактерий, и представляют собой новую терапевтическую мишень для борьбы с антибиотикорезистентными бактериями [39, 62].

В исследовании Y.Bai et al. (2024) была показана роль sRNA51 в устойчивости CR-Kp, продуцирующего KPC-2, регулируя экспрессию *acrA* [39]. При помощи qRT-PCR было показано, что экспрессия sRNA51 в клетках CR-Kp-штаммов, продуцирующих KPC-2, значительно превосходит экспрессию sRNA (количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией). Сверхэкспрессия sRNA51 снизила экспрессию *acrA*, что уменьшило устойчивость к меропенему и эртапенему, в то время как сверхэкспрессия *acrA* восстановила устойчивость к меропенему и эртапенему у штаммов с сверхэкспрессией sRNA51 (рис. 5).

Авторы делают вывод, что микроРНК sRNA51 может подавлять экспрессию *acrA* и что снижение уровня sRNA51 в CR-Kp, продуцирующем KPC-2, приводит к повышенной экспрессии *acrA* и повышает его устойчивость за эффлюксных насосов. Полученные данные указывают на возможность разработки новых адъювантов антибиотиков для восстановления чувствительности к ним у антибиотикорезистентных бактерий.

Аналогичный анализ, проведенный на штамме CR-Kp, продуцирующем карбапенемазу металло-β-лактамазу NDM-5, показал, что наиболее значительно дифференциально экс-



Рис. 5. Схематическое изображение взаимодействия sRNA51 и acrA [39].

Fig. 5. Schematic representation of the interaction between sRNA51 and acrA [39].

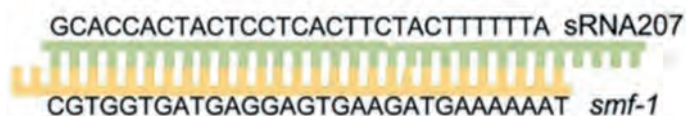


Рис. 6. Схематическое изображение взаимодействия sRNA207 и smf-1 [62].

Fig. 6. Schematic representation of the interaction between sRNA207 and smf-1 [62].

прессировалась sRNA207, для которой была предсказана мишень – матричная РНК (мРНК), кодируемая геном *smf-1*, ассоциированным с биопленкообразованием (рис. 6) [62].

Показано, что повышенная экспрессия sRNA207 способствовала образованию биопленок за счет стабилизации экспрессии гена *smf-1*, что, в свою очередь, влияло на устойчи-

вость клеток CR-Кр, продуцирующих NDM-5, к карбапенемам. Показано, что по сравнению со штаммом CR-Кр, продуцирующим NDM-5, биопленкообразование у штаммов с нокаутированным геном *smf-1* было снижено, а МПК карбапенемов для этих штаммов снизились: для меропенема – со 128 до 16 мг/л, для эртапенема – со 128 до 32 мг/л, для имипенема – со 128 до 32 мг/л. Полученные результаты открывают перспективу для нового подхода к лечению инфекций, вызванных CR-Кр [62].

Изучение гипермукоидности у hvКр на посттрансляционном уровне выявило регуляторную сеть sRNAs, ассоциированных с РНК-связывающим Hfq-белком [4]. Полученные данные показывают многочисленные взаимодействия между мРНК и мРНК, ассоциированными с гипермукоидностью. Капсульные полисахариды синтезируются и транслируются через мембрану посредством белковых продуктов кластера генов капсулы (*wza*, *wzc* и *wzi*). Транскрипция генов капсулы подавляется CRP посредством связывания с промоторами и посредством РНК-РНК-взаимодействия с мРНК ArcZ. CRP индуцирует транскрипцию предшественника ArcZ, который процессируется в мРНК ArcZ. ArcZ связывается с мРНК генов *mliA* и *fbp* и ингибирует их трансляцию. Снижение синтеза MliA нарушает асимметрию липидов

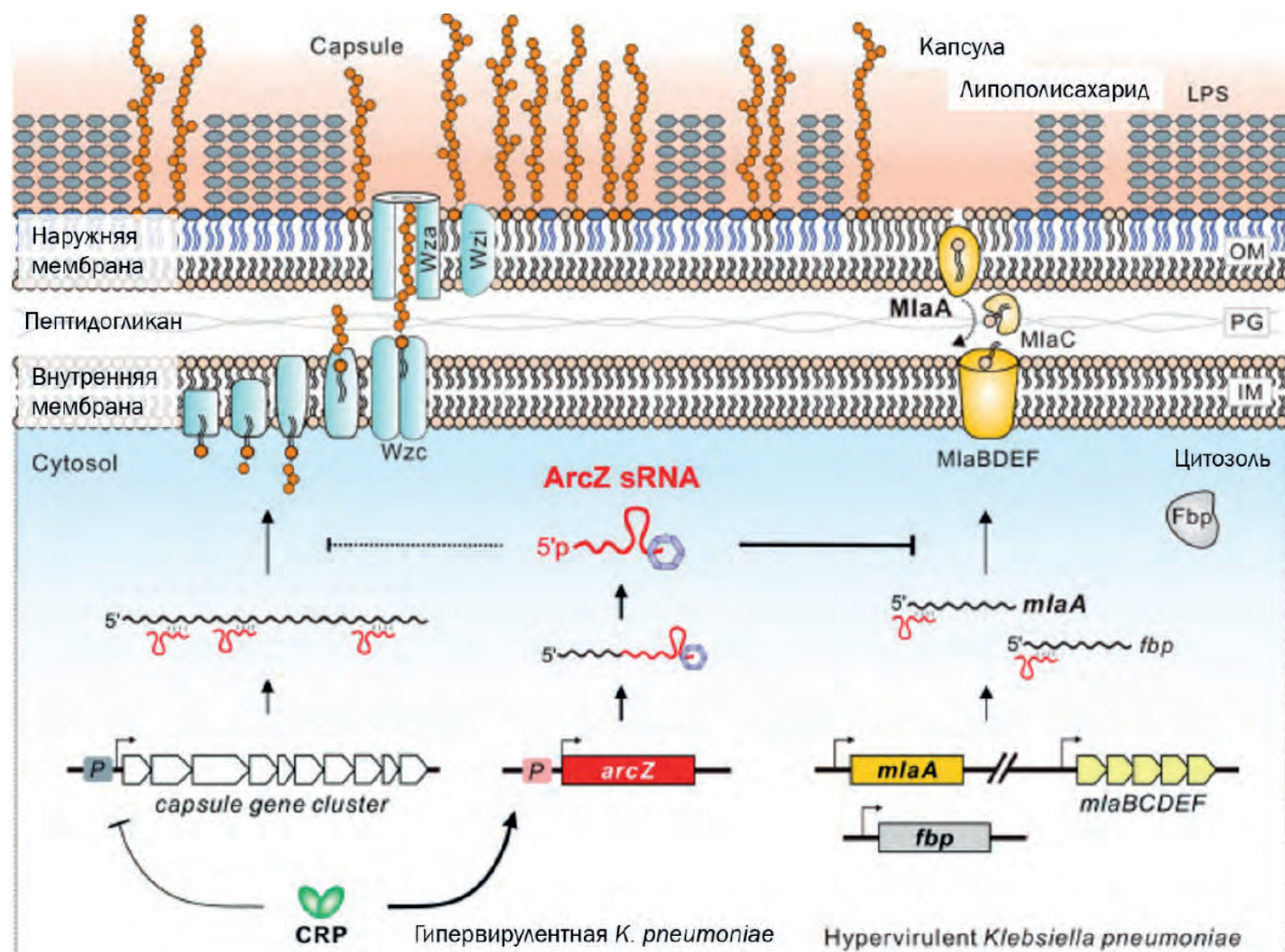


Рис. 7. Схема регуляции гипермукоидности опосредованной мРНК ArcZ у hvКр [4, с изменениями].

Fig. 7. Regulation of hypermucoidity mediated by mRNA ArcZ in hvKp [4, with changes]. LPS – lipopolysaccharide, OM – outer membrane, PG – peptidoglycan, IM – inner membrane.

внешней мембраны и гомеостаз фосфолипидов, вследствие чего снижается мощность капсулы и вирулентность для мышей (рис. 7).

Показано, что MlaA и его функция в транспорте фосфолипидов имеют решающее значение для формирования капсулы и проявления гипермукоидности, делеция которого существенно снижает вирулентность штамма hvKp на мышинной модели. Сверхэкспрессия ArcZ резко снижала бактериальную нагрузку у мышей и гипермукоидность у CR-hvKp клинических изолятов. Полученные данные указывают на то, что ArcZ может рассматриваться в качестве потенциального терапевтического препарата на основе РНК-ингибитора при бактериальной пневмонии [4].

Заключение

Инфекции, вызываемые *K. pneumoniae*, связаны с высоким уровнем смертности и заболеваемости как среди госпитальных, так и среди амбулаторных случаев [7]. Несмотря на то, что изначально проблема была наиболее острой именно в Азиатском регионе, сегодня отмечается тенденция к глобальному распространению CR-hvKp [15]. Всемирная организация здравоохранения недавно включила *K. pneumoniae* в список критически важных микроорганизмов, для лечения которых срочно требуются новые препараты.

При лечении инфекций, вызванных этим патогеном, существует несколько серьезных клинических проблем. Во-первых, быстрое распространение и вспышки CR-hvKp в медицинских учреждениях представляют серьезную проблему для инфекционного контроля. Высокий уровень резистентности и патогенности часто приводит к негативным клиническим исходам [3]. Во-вторых, появляются штаммы CR-hvKp, продуцирующие более одного типа карбапенемаз. Рост числа штаммов, устойчивых к антибиотикам «последней надежды», значительно сузил, а в некоторых случаях и вовсе исключил терапевтические возможности для лечения инфекций, вызванных гибридными штаммами *K. pneumoniae*.

В последние годы выявлены факты изменения фенотипических свойств, связанных с вирулентностью, у CR-hvKp-штаммов, вызвавших тяжелые инфекции, при воздействии на них АМП в терапевтических дозах. Описаны случаи как повышения, так и понижения вирулентных свойств штаммов *K. pneumoniae* в ответ на присутствие АМП. Данные факты указывают на острую необходимость расширения понимания механизмов адаптации современных клонов патогенных микроорганизмов в условиях интенсивного применения АМП. Изучение транскриптомов гибридных штаммов может рассматриваться как перспективный подход не только к выяснению новых молекулярно-генетических механизмов реализации комплексных геномов, но также и как метод поиска новых перспективных мишеней, адъювантов и регуляторных молекул для создания инновационных комбинированных лекарственных препаратов.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора

Financial support

The work was carried out within the framework of the Sectoral Scientific Program of Rosпотребнадзор

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

1. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al.; Burden of AMR Collaborative Group. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis*. 2019 Jan;19(1):56-66. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30605-4
2. Russo TA, Olson R, Fang CT, Stoesser N, Miller M, MacDonald U, et al. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2018 Aug 27;56(9):e00776-18. DOI: 10.1128/JCM.00776-18
3. Chen T, Ying L, Xiong L, Wang X, Lu P, Wang Y, et al. Understanding carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Key virulence factors and evolutionary convergence. *hLife* 2024;2:611-624.
4. Wu K, Lin X, Lu Y, Dong R, Jiang H, Svensson SL, et al. RNA interactome of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* reveals a small RNA inhibitor of capsular mucoviscosity and virulence. *Nat Commun*. 2024 Aug 13;15(1):6946. DOI: 10.1038/s41467-024-51213-z
5. Lev AI, Astashkin EI, Kislichkina AA, Solovieva EV, Kombarova TI, Korobova OV, et al. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2012–2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles. *Pathog Glob Health*. 2018 May;112(3):142-151. DOI: 10.1080/20477724.2018.1460949
6. Rastegar S, Moradi M, Kalantar-Neyestanaki D, Ali Golabi D, Hosseini-Nave H. Virulence Factors, Capsular Serotypes and Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* and Classical *Klebsiella pneumoniae* in Southeast Iran. *Infect Chemother*. 2019 Sep 25. DOI: 10.3947/ic.2019.0027
7. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016 Jun 15;80(3):629-61. DOI: 10.1128/MMBR.00078-15
8. Yang C, Xu Q, Xie M, Tang Y, Hu Q, Heng H, et al. Enhancing resistance, but not virulence attributed to the high mortality caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Res*. 2024 Aug;285:127769. DOI: 10.1016/j.micres.2024.127769
9. Liu Y-C. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis. *Arch Intern Med*. 1986;146:1913. DOI: 10.1001/archinte.1986.00360220057011
10. Liu C, Guo J. Characteristics of ventilator-associated pneumonia due to hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* genotype in genetic background for the elderly in two tertiary hospitals in China. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018 Aug 3;7:95. DOI: 10.1186/s13756-018-0371-8
11. Mackow NA, Shen J, Adnan M, Khan AS, Fries BC, Diago-Navarro E. CRISPR-Cas influences the acquisition of antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *PLOS ONE*. 2019;14(11):e0225131. DOI: 10.1371/journal.pone.0225131
12. Li N, Wang L, Wang F, Chen H, Tao S, Zhu Q, et al. Rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* carrying virulence gene *rmpA2* by recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strips. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 May 19;12:877649. DOI: 10.3389/fcimb.2022.877649
13. Wyres KL, Nguyen TNT, Lam MMC, Judd LM, van Vinh Chau N, Dance DAB, et al. Genomic surveillance for hypervirulence and multi-drug resistance in invasive *Klebsiella pneumoniae* from South and Southeast Asia. *Genome Med*. 2020 Jan 16;12(1):11. DOI: 10.1186/s13073-019-0706-y
14. Xu Y, Zhang J, Wang M, Liu M, Liu G, Qu H, et al. Mobilization of the nonconjugative virulence plasmid from hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Genome Med*. 2021 Jul 22;13(1):119. DOI: 10.1186/s13073-021-00936-5

15. He J, Du X, Zeng X, Moran RA, van Schaik W, Zou Q, et al. Phenotypic and genotypic characterization of a hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST17-KL38 clinical isolate harboring the carbapenemase IMP-4. *Microbiol Spectr*. 2022 Apr 27;10(2):e0213421. DOI: 10.1128/spectrum.02134-21
16. Wyres KL, Wick RR, Judd LM, Froumine R, Tokolyi A, Gorrie CL, et al. Distinct evolutionary dynamics of horizontal gene transfer in drug resistant and virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS Genet*. 2019 Apr 15;15(4):e1008114. DOI: 10.1371/journal.pgen.1008114
17. Kochan TJ, Nozick SH, Valdes A, Mitra SD, Cheung BH, Lebrun-Corbin M, et al. *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with features of both multidrug-resistance and hypervirulence have unexpectedly low virulence. *Nat Commun*. 2023 Dec 2;14(1):7962. DOI: 10.1038/s41467-023-43802-1
18. Maurya N, Jangra M, Tambat R, Nandanwar H. Alliance of efflux pumps with β -lactamases in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Microb Drug Resist*. 2019 Oct;25(8):1155-1163. DOI: 10.1089/mdr.2018.0414
19. Tsai YK, Fung CP, Lin JC, Chen JH, Chang FY, Chen TL, et al. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:1485-1493. DOI: 10.1128/AAC.01275-10
20. Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Jun;53(6):2227-38. DOI: 10.1128/AAC.01707-08
21. Meletis G. Carbapenem resistance: Overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis*. 2016 Feb;3(1):15-21. DOI: 10.1177/2049936115621709
22. Han YL, Wen XH, Zhao W, Cao XS, Wen JX, Wang JR, et al. Epidemiological characteristics and molecular evolution mechanisms of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol*. 2022 Sep 12;13:1003783. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1003783
23. Mukherjee S, Naha S, Bhadury P, Saha B, Dutta M, Dutta S, et al. Emergence of OXA-232-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST23 causing neonatal sepsis. *J Antimicrob Chemother*. 2020 Jul 1;75(7):2004-2006. DOI: 10.1093/jac/dkaa080
24. Sanikhani R, Moeinirad M, Solgi H, Hadadi A, Shahcheraghi F, Badmasti F. The face of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples of two Iranian teaching hospitals. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2021 Aug 31;20(1):58. DOI: 10.1186/s12941-021-00467-2
25. Lorenzin G, Gona F, Battaglia S, Spitaleri A, Saluzzo F, Trovato A, et al. Detection of NDM-1/5 and OXA-48 co-producing extensively drug-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in Northern Italy. *J Glob Antimicrob Resist*. 2022 Mar;28:146-150. DOI: 10.1016/j.jgar.2022.01.001
26. Yang X, Sun Q, Li J, Jiang Y, Li Y, Lin J, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in China. *Emerg Microbes Infect*. 2022 Dec;11(1):841-849. DOI: 10.1080/22221751.2022.2049458
27. Golikova MV, Strukova EN, Alieva KN, Ageevets VA, Avdeeva AA, Sulian OS, et al. Meropenem MICs at standard and high inocula and mutant prevention concentration inter-relations: comparative study with non-carbapenemase-producing and OXA-48, KPC- and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antibiotics (Basel)*. 2023 May 8;12(5):872. DOI: 10.3390/antibiotics12050872
28. Yang Y, Yang Y, Ahmed MAEE, Qin M, He R, Wu Y, et al. Carriage of distinct *blaKPC-2* and *blaOXA-48* plasmids in a single ST11 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolate in Egypt. *BMC Genomics*. 2022 Jan 8;23(1):20. DOI: 10.1186/s12864-021-08214-9
29. Shankar C, Nabarro LE, Anandan S, Ravi R, Babu P, Munusamy E, et al. Extremely high mortality rates in patients with carbapenem-resistant, hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* blood stream infections J Assoc Physicians India. *J Assoc Physicians India*. 2018 Dec;66(12):13-16.
30. Remya P, Shanthi M, Sekar U. Occurrence and characterization of hyperviscous K1 and K2 serotype in *Klebsiella pneumoniae*. *J Lab Physicians*. 2018 Jul-Sep;10(3):283-288. DOI: 10.4103/JLP.JLP_48_18
31. Scaltriti E, Piccinelli G, Corbellini S, Caruso A, Latronico N, De Francesco MA. Detection of a hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-5 and OXA-48 carbapenemases with sequence type 383, Brescia, Italy. *Int J Antimicrob Agents*. 2020 Oct;56(4):106130. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106130
32. Solgi H, Shahcheraghi F, Bolourchi N, Ahmadi A. Molecular characterization of carbapenem-resistant serotype K1 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST11 harbouring *Bla*(NDM-1) and *Bla*(OXA-48) carbapenemases in Iran. *Microb Pathog*. 2020;149:104507. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104507
33. Bolourchi N, Shahcheraghi F, Giske CG, Nematzadeh S, Noori Goodarzi N, Solgi H, et al. Comparative genome analysis of colistin-resistant OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical strains isolated from two Iranian hospitals. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2021 Oct 23;20(1):74. DOI: 10.1186/s12941-021-00479-y
34. Lorenzin G, Gona F, Battaglia S, Spitaleri A, Saluzzo F, Trovato A, et al. Detection of NDM-1/5 and OXA-48 co-producing extensively drug-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in Northern Italy. *J Glob Antimicrob Resist*. 2022 Mar;28:146-150. DOI: 10.1016/j.jgar.2022.01.001
35. Kuzina ES, Kislichkina AA, Sizova AA, Skryabin YP, Novikova TS, Ershova ON, et al. High-molecular-weight plasmids carrying carbapenemase genes *blaNDM-1*, *blaKPC-2*, and *blaOXA-48* coexisting in clinical *Klebsiella pneumoniae* strains of ST39. *Microorganisms*. 2023 Feb 11;11(2):459. DOI: 10.3390/microorganisms11020459
36. Lv F, Cai J, He Q, Wang W, Luo Y, Wang X, et al. Overexpression of efflux pumps mediate pan resistance of *Klebsiella pneumoniae* sequence Type 11. *Microb Drug Resist*. 2021 Oct;27(10):1405-1411. DOI: 10.1089/mdr.2020.0395
37. Tam HK, Foong WE, Oswald C, Herrmann A, Zeng H, Pos KM. Allosteric drug transport mechanism of multidrug transporter AcrB. *Nat Commun*. 2021 Jun 29;12(1):3889. DOI: 10.1038/s41467-021-24151-3
38. Lee YJ, Huang CH, Ihsan NA, Lee IH, Huang TW. Molecular epidemiology and characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from urine at a teaching hospital in Taiwan. *Microorganisms*. 2021 Jan 28;9(2):271. DOI: 10.3390/microorganisms9020271
39. Bai Y, Xie C, Zhang Y, Zhang Z, Liu J, Cheng G, et al. sRNA expression profile of KPC-2-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: Functional role of sRNA51. *PLoS Pathog*. 2024 May 8;20(5):e1012187. DOI: 10.1371/journal.ppat.1012187
40. Rosenblum R, Khan E, Gonzalez G, Hasan R, Schneiders T. Genetic regulation of the *ramA* locus and its expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents*. 2011 Jul;38(1):39-45. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2011.02.012
41. Nishino K, Yamaguchi A. Role of histone-like protein H-NS in multidrug resistance of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2004;186:1423-1429. DOI: 10.1128/JB.186.5.1423-1429.2004
42. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jan;54(1):177-83. DOI: 10.1128/AAC.00715-09
43. Bialek-Davenet S, Lavigne JP, Guyot K, Mayer N, Tournebise R, Brisse S, et al. Differential contribution of AcrAB and OqxAB efflux pumps to multidrug resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Jan;70(1):81-8. DOI: 10.1093/jac/dku340
44. Shu R, Liu G, Xu Y, Liu B, Huang Z, Wang H. AcrAB efflux pump plays a crucial role in bile salts resistance and pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Antibiotics (Basel)*. 2024 Nov 29;13(12):1146. DOI: 10.3390/antibiotics13121146
45. Srinivasan VB, Vaidyanathan V, Mondal A, Rajamohan G. Role of the two component signal transduction system CpxAR in conferring cefepime and chloramphenicol resistance in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. *PLoS One*. 2012;7(4):e33777. DOI: 10.1371/journal.pone.0033777
46. Liu Z, Guan J, Chen Z, Tai C, Deng Z, Chao Y, et al. CpxR promotes the carbapenem antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* by directly regulating

- the expression and the dissemination of *blaKPC* on the IncFII conjugative plasmid. *Emerg Microbes Infect.* 2023 Dec;12(2):2256427. DOI: 10.1080/22221751.2023.2256427
47. Wang XD, Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen G-X. Reduced susceptibility to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates associated with plasmid-mediated β -lactamase production and OmpK36 porin deficiency. *J Med Microbiol.* 2009 Sep;58(Pt 9):1196-1202. DOI: 10.1099/jmm.0.008094-0
48. Jiang M, Qiu X, Shui S, Zhao R, Lu W, Lin C, et al. Differences in molecular characteristics and expression of virulence genes in carbapenem-resistant and sensitive *Klebsiella pneumoniae* isolates in Ningbo, China. *Front Microbiol.* 2024 Feb 7;15:1356229. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1356229
49. Wang L, Huang X, Jin Q, Tang J, Zhang H, Zhang JR, et al. Two-component response regulator OmpR regulates mucoviscosity through energy metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Spectr.* 2023 Jun 15;11(3):e0054423. DOI: 10.1128/spectrum.00544-23
50. Liang J, Lin S, He L. Formation ability and drug resistance mechanism of *Klebsiella pneumoniae* biofilm and capsule for multidrug-resistant. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2023; 69:88-93. DOI: 10.14715/cmb/2023.69.10.12
51. Mukherjee S, Bhadury P, Mitra S, Naha S, Saha B, Dutta S, et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* causing neonatal bloodstream infections: emergence of NDM-1-producing hypervirulent ST11-K2 and ST15-K54 strains possessing pLVPK-associated markers. *Microbiol Spectr* 2023;11:e0412122. DOI: 10.1128/spectrum.04121-22
52. Li Y, Ni M. Regulation of biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol.* 2023 Sep 7;14:1238482. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1238482
53. Al-Bayati M, Samarasinghe S. Biofilm and gene expression characteristics of the carbapenem-resistant *Enterobacteriales*, *Escherichia coli* IMP, and *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 associated with common bacterial infections. *Int J Environ Res Public Health.* 2022 Apr 14;19(8):4788. DOI: 10.3390/ijerph19084788
54. Hoang J, Stoebel DM. The transcriptional response to low temperature is weakly conserved across the *Enterobacteriaceae*. *mSystems.* 2024 Dec 17;9(12):e0078524. DOI: 10.1128/msystems.00785-24
55. Cain AK, Boinett CJ, Barquist L, Dordel J, Fookes M, Mayho M, et al. Morphological, genomic and transcriptomic responses of *Klebsiella pneumoniae* to the last-line antibiotic colistin. *Sci Rep.* 2018 Jun 29;8(1):9868. *Sci Rep.* 2018 Jun 29;8(1):9868. DOI: 10.1038/s41598-018-28199-y
56. Wright MS, Suzuki Y, Jones MB, Marshall SH, Rudin SD, van Duin D, et al. Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Jan;59(1):536-43. DOI: 10.1128/AAC.04037-14
57. Fang J, Lai H, Deng M, Mei Y, Chen D, Hou T, et al. Mechanism of virulence polymorphism in CR-hvKp strains from the same source. *Microbiol Spectr.* 2025 Jul;13(7):e0246424. DOI: 10.1128/spectrum.02464-24
58. Long D, Zhu LL, Du FL, Xiang TX, Wan LG, Wei DD, et al. Phenotypic profile and global transcriptomic profile of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* due to carbapenemase-encoding plasmid acquisition. *BMC Genomics.* 2019 Jun 11;20(1):480. DOI: 10.1186/s12864-019-5705-2
59. Bina XR, Weng Y, Budnick J, Van Allen ME, Bina JE. *Klebsiella pneumoniae* TolC contributes to antimicrobial resistance, exopolysaccharide production, and virulence. *Infect Immun.* 2023 Dec 12;91(12):e0030323. DOI: 10.1128/iai.00303-23
60. De Majumdar S, Yu J, Fookes M, McAteer SP, Llobet E, Finn S, et al. Elucidation of the RamA regulon in *Klebsiella pneumoniae* reveals a role in LPS regulation. *PLoS Pathog.* 2015 Jan 29;11(1):e1004627. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004627
61. Park S, Kim H, Ko KS. Reduced virulence in tigecycline-resistant *Klebsiella pneumoniae* caused by overexpression of ompR and down-regulation of ompK35. *J Biomed Sci.* 2023 Mar 31;30(1):22. DOI: 10.1186/s12929-023-00910-w
62. Xie C, Bai Y, Li Y, Cui B, Cheng G, Liu J, et al. Revealing sRNA expression profiles of NDM-5-producing CRKp and explore the role of sRNA207 in NDM-5-producing CRKp resistance. *Microbiol Spectr.* 2024 Nov 7;12(12):e0153724. DOI: 10.1128/spectrum.01537-24

Информация об авторах:

Губанов Сергей Вячеславович, студент 4-го курса биологического факультета Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н.Г.Чернышевского

Фурсов Михаил Васильевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела коллекционных культур Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора

Фурсова Надежда Константиновна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора

Information about authors:

Sergey V. Gubanov, 4th year student of the Faculty of Biology, N.G.Chernyshevsky Saratov National Research State University

Mikhail V. Fursov, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Culture Collections Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Nadezhda K. Fursova, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Molecular Microbiology Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Правила оформления статей

(основные положения)

Журнал «Бактериология» публикуется на русском языке (резюме статей и ключевые слова – на русском и английском языках), распространяется на бумажном носителе и публикуется в электронной форме.

К публикации принимаются экспериментальные и обзорные статьи, а также короткие сообщения по прикладным и фундаментальным вопросам медицинской, ветеринарной и сельскохозяйственной бактериологии. Статьи принимаются без ограничения объема от граждан любой страны на русском языке. По согласованию с редакцией допускается публикация рекламных материалов, соответствующих тематике журнала.

Публикации, созданные в порядке выполнения служебного задания, должны иметь направление от учреждения, в котором выполнена работа. В направлении следует указать, что представленный материал ранее не был нигде опубликован и не находится на рассмотрении для публикации в других изданиях (включая зарубежные).

К публикации прилагается экспертное заключение организации об отсутствии ограничений для открытой публикации представленных материалов.

Материалы для публикации, включая сопровождающие документы, направляются в редакцию в электронной форме по адресу: info@obolensk.org или bacteriology@obolensk.org. В теме сообщения следует указать «Бактериология».

Требования к оформлению статьи.

Экспериментальная статья должна состоять из разделов: введение, материалы и методы, результаты и обсуждение, список литературы.

Рукопись должна быть подготовлена в текстовом редакторе MS Word, шрифт – Times New Roman, размер – 14, межстрочный интервал – 1,5, поля – 2 см. Статья должна включать резюме и ключевые слова на русском и английском языках. Нумерация всех страниц рукописи сквозная.

Краткие сообщения представляются без таблиц и рисунков.

Статья должна быть подписана всеми авторами, включая иностранных.

К статье следует приложить сведения об авторе 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 отправляется авторам на доработку.

Редакция оставляет за собой право редактировать статьи по согласованию с автором.

Присланные в редакцию статьи проходят процедуру рецензирования. В случае отклонения статьи редакция направляет автору мотивированный отказ.

Публикация – бесплатная.

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

Тел. (4967) 36-00-46
Факс (4967) 36-00-10

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

Подписку на журналы Издательства «Династия» можно оформить:

В любом почтовом отделении России по объединенному каталогу «Пресса России»

Вопросы практической педиатрии	Индекс: 87946	Инфекционные болезни	Индекс: 12919
Вопросы детской диетологии	Индекс: 12917	Вопросы диетологии	Индекс: 90955
Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии	Индекс: 12916	Вопросы урологии и андрологии	Индекс: 91823

Через альтернативные подписные издательства

ООО «Урал-Пресса» – www.ural-press.ru
Электронный каталог «Пресса России» – www.pressa-rr.ru

**Через сайт издательства www.phdynasty.ru для физических лиц
и через издательство для юридических лиц
с любого номера текущего года на любой период**

Наименование журнала	Для физических лиц		Для юридических лиц	
	руб./полугодие	руб./год	руб./полугодие	руб./год
Вопросы практической педиатрии	1800	3600	2400	4800
Вопросы детской диетологии	1800	3600	2400	4800
Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии	1800	3600	2400	4800
Инфекционные болезни	1200	2400	1600	3200
Вопросы диетологии	1200	2400	1600	3200
Вопросы урологии и андрологии	1200	2400	1600	3200

ВНИМАНИЕ!

Для выставления счета юридическим лицам достаточно прислать заявку по e-mail: podpiska@phdynasty.ru
В заявке необходимо обязательно указать реквизиты организации, название журнала, период подписки, контактный телефон, e-mail и ответственное лицо.

Адрес: 119019, Москва, Г-19, а/я 229, тел./факс: (495) 660-6004
e-mail: podpiska@phdynasty.ru, www.phdynasty.ru