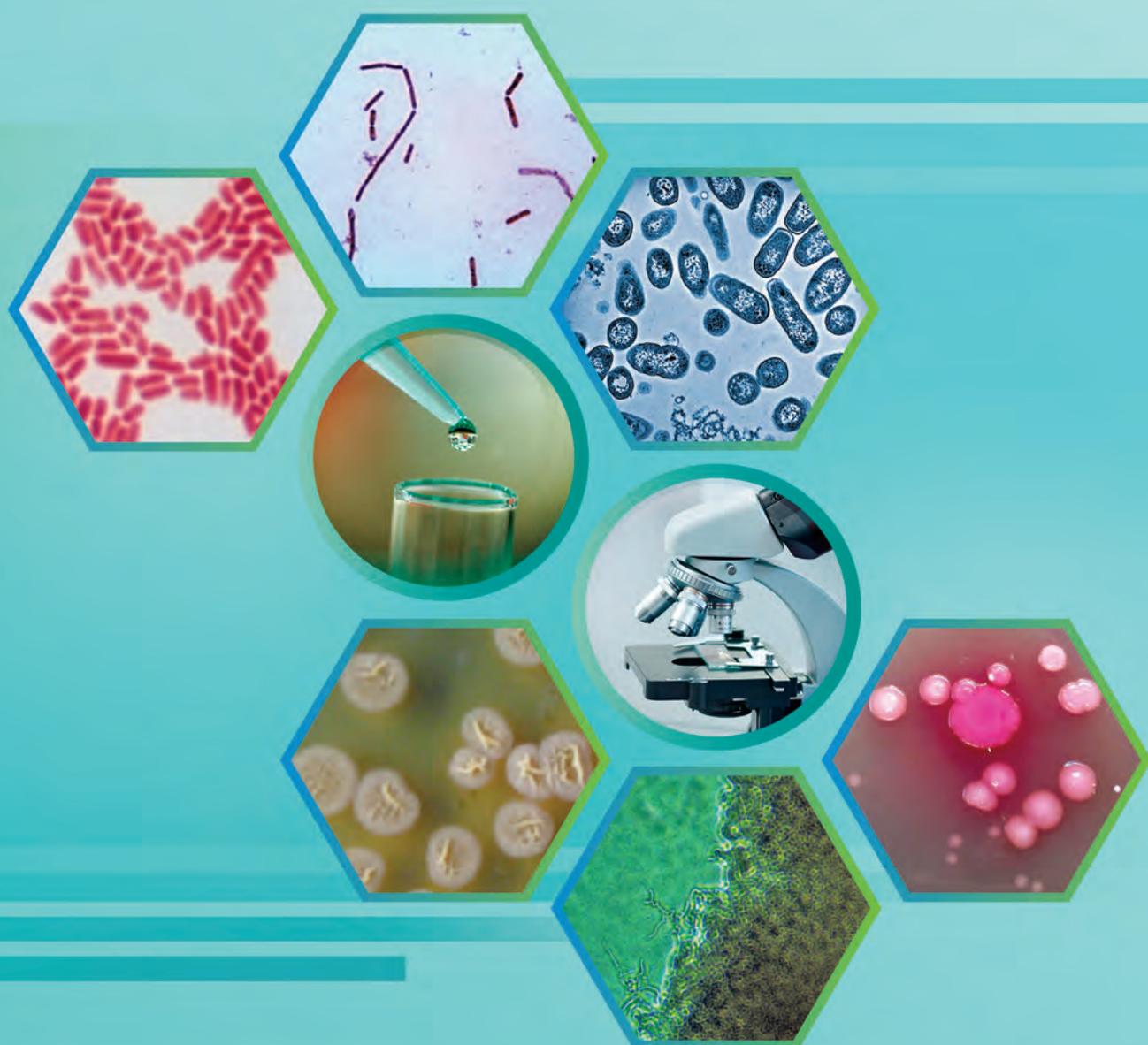


БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2017 • ТОМ 2 • №2

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, член-корр. 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 (Китай)

Редколлегия

Адъяасүрэн Зэвиймядагийн, к.м.н. (Монголия)	И.Х.Маматкулов, д.м.н., проф. (Узбекистан)
И.А.Базиков, д.м.н., проф. (Россия)	Т.В.Мека-Меченко, д.м.н. (Казахстан)
В.А.Горбунов, к.м.н. (Белоруссия)	В.Л.Мотин, проф. (США)
В.А.Давидянц, д.б.н., проф. (Армения)	А.Ракин (Германия)
С.В.Дентовская, д.м.н. (Россия)	Э.А.Светоч, д.в.н., проф. (Россия)
Л.В.Домотенко, к.х.н. (Россия)	В.Н.Царев, д.м.н., проф. (Россия)
Г.А.Каримова, к.б.н. (Франция)	Л.Н.Черноусова, д.б.н., проф. (Россия)
А.В.Карлышев, к.х.н. (Великобритания)	К.Ю.Шаталин, к.б.н. (США)
Л.В.Коломбет, д.б.н. (Россия)	И.Г.Шемякин, д.б.н., проф. (Россия)
М.Косой, к.б.н. (США)	А.П.Шепелин, д.б.н. (Россия)
Ш.Х.О.Курбанов, к.м.н. (Азербайджан)	

Учредитель

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

Адрес учредителя и редакции:

142279, Московская область,
Серпуховский район, п. Оболенск
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

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 1000 экз. Цена свободная.
Отдел рекламы:
Телефон: +7 495 517-7055

От главного редактора

К вопросу о сапронозах, психрофильности и патогенах. 5

Биологические свойства штаммов возбудителя брюшного тифа *Salmonella typhi*,
выделенных в Российской Федерации в 2005–2017 гг.
Л.А.Кафтырева, С.А.Егорова, З.Н.Матвеева, М.А.Макарова, Е.В.Войтенкова. 7

Сполиготимирование штаммов микобактерий туберкулеза, выделенных от ВИЧ-положительных
и ВИЧ-отрицательных больных туберкулезом Свердловской области
Г.В.Панов, С.Н.Андреевская, Е.Е.Ларионова, Т.Г.Смирнова, А.И.Цветков, А.Э.Эргешов, Л.Н.Черноусова 14

Разработка компьютерной программы для количественной оценки цифрового
изображения бактерий, полученного с помощью трансмиссионного электронного микроскопа
С.О.Навольева. 20

Автоматизированная система оценки пролиферативной активности эукариотических
клеток в токсикологических исследованиях *in vitro*
Л.В.Коломбет. 24

Сравнительное секвенирование транскриптомов культур *Yersinia pestis subsp. microti* *bv. ulegeica*,
отличающихся по вирулентности для морских свинок
В.И.Соломенцев, Л.А.Кадникова, А.А.Кисличкина, Н.В.Майская,
Т.И.Комбарова, М.Е.Платонов, А.Г.Богун, А.П.Анисимов 30

Способ культивирования дифтерийных микробов
Г.Г.Харсеева, Э.Л.Алутина, А.П.Шепелин, О.В.Полосенко, Т.Д.Гасретова 36

Микробиологический контроль качества пищевой продукции
А.П.Шепелин, И.А.Дятлов, О.В.Полосенко 39

Чувствительность и формирование устойчивости к антисептикам и дезинфектантам
у возбудителей внутрибольничных инфекций
И.А.Дятлов, Е.В.Детушева, И.П.Мицевич, К.В.Детушев, Я.В.Подкопаев, Н.К.Фурсова. 48

Морфофункциональные особенности высокочувствительных к дезинфицирующим средствам
бактерий *Escherichia coli* K-12 при воздействии дезинфицирующего средства «Тотус»
В.Н.Герасимов, А.Е.Конев, Н.Б.Роганова, Р.Л.Гутерман, А.И.Комарова,
Н.В.Киселева, Е.В.Быстрова, Ю.В.Герасимова, С.А.Котов, М.В.Храмов 59

Электронно-микроскопическое исследование деструктивного влияния на клетки
Escherichia coli антимикробного вещества, синтезируемого *Bacillus lentus* B-7150
В.Д.Похиленко, В.Н.Герасимов, В.В.Перелыгин, Т.А.Калмантаев, Ю.В.Герасимова, С.А.Котов 66

Научная жизнь

О работе 7-го конгресса европейских микробиологов (FEMS 2017)
9–13 июля 2017 г., г. Валенсия (Испания) 71

Правила для авторов 76

BACTERIOLOGY

Scientific and Practical Journal

Editor-in-Chief

I.A.Dyatlov, academician of RAS
(Russia)

Executive Secretary

I.G.Govorunov, Sc.D.
(Russia)

Editorial Council

A.P.Anisimov, Sc.D., prof. (Russia)
S.V.Balakhonov, Sc.D., prof. (Russia)
A.N.Kulichenko, corr. member 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 (China)

Editorial Board

Ad"yaasyren Zeviimyadagiin, PhD (Mongolia)
I.A.Bazikov, Sc.D., prof. (Russia)
L.N.Chernousova, Sc.D., prof. (Russia)
V.A.Davidyants, Sc.D., prof. (Armenia)
S.V.Dentovskaya, Sc.D. (Russia)
L.V.Domotenko, PhD (Russia)
V.A.Gorbunov, PhD (Belarus)
G.A.Karimova, PhD (France)
A.V.Karlyshev, PhD (UK)
L.V.Kolombet, Sc.D. (Russia)
M.Kosoi, PhD (USA)

Sh.Kh.O.Kurbanov, PhD (Azerbaijan)
I.Kh.Mamatkulov, Sc.D., prof. (Uzbekistan)
T.V.Meka-Mechenko, Sc.D. (Kazakhstan)
V.L.Motin, prof. (USA)
A.Rakin (Germany)
K.Yu.Shatalin, PhD (USA)
I.G.Shemyakin, Sc.D., prof. (Russia)
A.P.Shepelin, 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

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: +7 495 517 7055; e-mail: reklama@mm-agency.ru

Editor-in-Chief's Introduction

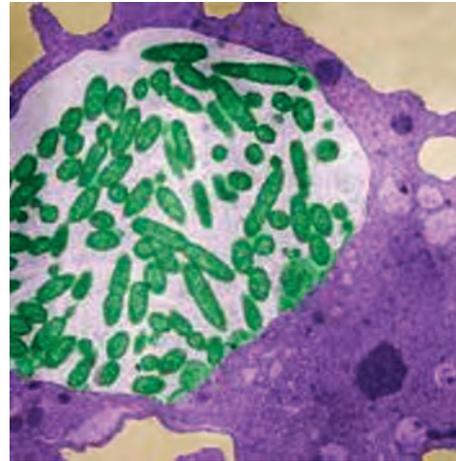
Sapronoses, psychrophilia and pathogens	5
Biological properties of strains of the causative agent of typhoid fever <i>Salmonella typhi</i> , isolated in the Russian Federation in 2005–2017 <i>L.A.Kaftyreva, S.A.Egorova, Z.N.Matveeva, M.A.Makarova, E.V.Voitenkova</i>	7
Spoligotyping of <i>M. tuberculosis</i> strains, isolated from HIV-positive and HIV-negative TB patients of Sverdlovsk region <i>G.V.Panov, S.N.Andreevskaya, E.E.Larionova, T.G.Smirnova,</i> <i>A.I.Tsvetkov, A.E.Ergeshov, L.N.Chernousova</i>	14
The computer program for a quantitative estimation of the digital image of bacteria received by transmission electronic microscope <i>S.O.Navolnev</i>	20
An autosystem for measuring proliferative activity of eukaryotic cells in toxicological research <i>in vitro</i> <i>L.V.Kolombet</i>	24
Comparative sequencing of transcriptomes of <i>Yersinia pestis subsp. microti</i> <i>bv. ulegeica</i> , different by virulence for guinea pigs <i>V.I.Solomentsev, L.A.Kadnikova, A.A.Kislichkina, N.V.Mayskaya,</i> <i>T.I.Kombarova, M.E.Platonov, A.G.Bogun, A.P.Anisimov</i>	30
The method of cultivation of diphtheria microbes <i>G.G.Kharseeva, E.L.Alutina, A.P.Shepelin, O.V.Polosenko, T.D.Gasretova</i>	36
Microbiological control of food products quality <i>A.P.Shepelin, I.A.Dyatlov, O.V.Polosenko</i>	39
Sensitivity and formation of stability to antiseptics and disinfectants in hospital infections <i>I.A.Dyatlov, E.V.Detusheva, I.P.Mitsevich, K.V.Detushev, Ya.V.Podkopaev, N.K.Fursova</i>	48
Morfo-functional features of highly sensitive to disinfectants bacteria <i>Escherichia coli</i> K-12 after influence of disinfectant «Totus» <i>V.N.Gerasimov, A.E.Konev, N.B.Roganova, R.L.Guterman, A.I.Komarova,</i> <i>N.V.Kiseleva, E.V.Bystrova, Yu.V.Gerasimova, S.A.Kotov, M.V.Khramov</i>	59
Electron microscopic study of the destructive effect of antimicrobial substances synthesized by <i>Bacillus lentus</i> B-7150 on <i>Escherichia coli</i> cells <i>V.D.Pokhilenko, V.N.Gerasimov, V.V.Pereygin, T.A.Kalmantaev, Yu.V.Gerasimova, S.A.Kotov</i>	66

Scientific Life

About the 7 th Congress of European Microbiologists (FEMS 2017) July 9-13, 2017, Valencia, Spain.	71
Instructions for Authors	76

К вопросу о сапронозах, психрофильности и патогенах

Почва селитебных территорий, агроценозов и агро-сферы в целом обладает функцией элиминации патогенных микроорганизмов благодаря в основном автохтонной микрофлоре, однако некоторые болезнетворные бактерии могут длительно сохраняться в почве, включаться в биоценозы, или почва и вода являются их основной средой обитания (возбудители ботулизма, столбняка, легионеллеза и др.). Продукты жизнедеятельности человека и домашних животных способствуют размножению и длительной жизнеспособности патогенов в почве и воде, а также приобретению у них разных видов устойчивостей и вредных мутаций. Механизмы, обеспечивающие такие процессы, еще недостаточно изучены на уровне функционирования генома и регуляции метаболизма, что является одной из важных задач как для эпидемиологии, так для эпизоотологии и земледелия.



В этой связи наибольшую значимость могут иметь такие явления, как возможность длительного существования патогенных бактерий во внешней среде – сапронозность и способность к размножению в условиях низких температур – психрофильность.

Разные исследователи относят к сапронозам целый ряд возбудителей таких инфекционных болезней, как лептоспироз, легионеллез, листериоз, мелиоидоз, псевдотуберкулез, иерсиниоз, сибирская язва, синегнойная инфекция, холера, клостридиозы (столбняк, газовая гангрена, ботулизм), рожа, сальмонеллез, пастереллез и некоторые другие.

Для более глубокого понимания поведения бактерий во внешней среде следует обратиться к теоретическим разработкам в области популяционной микробиологии и экологии. Известны разные стратегии поведения бактерий во внешней среде: r-стратегия связана с резкими колебаниями скорости размножения в зависимости от условий и наличия субстрата, K-стратегия определяется сохранением устойчивого уровня размножения и метаболизма в переменных условиях и высокой конкурентоспособностью (Паников Н.С., Звягинцев Д.Г., 1983; Одум Ю., 1986). Большинство патогенных микроорганизмов, имеющих высокий репродуктивный потенциал, относятся к r-стратегам, что позволяет им бурно размножаться в фазу патогенности. Однако некоторые сапронозы могут менять метаболизм при недостатке питания и низкой температуре, во внешней среде. Так, *Listeria monocytogenes* обладают обоими видами стратегий, положительные свойства каждой из которых способствуют выживаемости популяции в фазах патогенности и сапрофитности (Беленева И.А., 1996).

Особую проблему представляет наличие патогенных биологических агентов в зоне вечной мерзлоты, где имеются колоссальные залежи органического углерода. Потепление климата и переработка углерода в углекислый газ и метан могут привести к катастрофическим последствиям для планеты и будут способствовать еще более ускоренному оттаиванию мерзлоты.

При оттаивании почвы, благодаря накоплению низкомолекулярных метаболитов сапрофитов и продуктов их аутолиза, локальной ферментации продуктов жизнедеятельности животных и их останков, создаются благоприятные условия для активации патогенных микроорганизмов, попавших в почву с трупами животных 10–20 тыс. лет назад (в основном споровых форм – родов *Bacillus* и *Clostridium*), а также в современный период. Это может привести к большей вероятности заражения животных активированными патогенами и их передачи к человеку. Такое явление наблюдалось в 2016 г. при вспышке сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе, где заболели большое количество оленей, от которых заразились люди.

Наши исследования проб вечной мерзлоты из Якутии позволили выявить несколько штаммов облигатных психрофильных сапрофитных бактерий рода *Bacillus*, которые не росли при комнатной

температуре. Это говорит о высокой вероятности приспособляемости бактерий к условиям размножения при низких температурах и утрате способности роста в нормальных условиях. Кроме того, выделение нами культур вирулентного сибиреязвенного микроба из вечной мерзлоты на глубине 2 и 3 метра может свидетельствовать о периодическом возобновлении жизнедеятельности данного вида микробов, наличии у него сапрофитической фазы размножения при сохранении основных факторов патогенности. Экспериментальные данные (Соркин Ю.И., 1988) также свидетельствуют о возможности активного размножения данного микроорганизма в почве, включаясь в почвенную биоценоотическую систему. Это, как мы видим из опыта ямальской вспышки, имеет и выраженное эпидемиологическое значение. По-видимому, сибиреязвенный микроб в сапрофитической фазе реализует К-стратегию, медленно размножаясь и экономя энергию для выживания, а в фазу патогенности является r-стратегом, интенсивно потребляя субстраты роста, синтезируя факторы вирулентности, достигает максимальной плотности популяции, а затем и спор. Такой приспособительный механизм, по-видимому, свойствен только сапронозам, тогда как сапрофиты в нем не нуждаются и реализуют только К-стратегию.

Большой интерес представляют данные об изменении метаболизма бактерий при переходе к психрофильности. Так, экономический коэффициент роста псевдотуберкулезного микроба по глюкозе в 5–7 раз выше при низкой температуре, чем при 37°C (Г.П.Сомов, 1988), что говорит о наличии механизма сохранения жизнеспособности популяции в сапрофитической фазе и реализации r-стратегии выживания.

В последние годы проводятся углубленные молекулярно-генетические исследования регуляции психрофильности, в основном на модели *Yersinia*, что позволило выявить новый регуляторный сенсорный белок, участвующий в процессе переключения метаболизма в условиях существования популяции при низких температурах и играющий существенную роль в проявлении вирулентности возбудителя (Herbst K., 2013; Righetti F., 2016; Nuss A.M., 2016).

Исследования стратегий поведения популяций бактерий в паразитической и сапрофитической фазах размножения, а также изменения их метаболизма при переходе к росту в условиях низких температур являются одной из задач современной бактериологии, которая должна быть решена на основе использования современных геномных и постгеномных методологий, с применением системного анализа для целей выбора стратегии и тактики санации почвенных очагов опасных болезней.



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

Биологические свойства штаммов возбудителя брюшного тифа *Salmonella typhi*, выделенных в Российской Федерации в 2005–2017 гг.

Л.А.Кафтырева^{1,2}, С.А.Егорова¹, З.Н.Матвеева¹, М.А.Макарова¹, Е.В.Войтенкова¹

¹ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация;

²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

В России более 70% случаев брюшного тифа являются «завозными» из стран ближнего и дальнего зарубежья. Популяция возбудителя гетерогенна по чувствительности к антибиотикам. 89,3% штаммов *S. typhi*, выделенных в 2005–2017 гг. в РФ, характеризуются устойчивостью к фторхинолонам, обусловленной мутациями в кодонах 83 и 87 гена *gyrA* (Asp87Asn, Ser83Tyr, Ser83Phe). Кроме того, популяция возбудителя включает штаммы с множественной устойчивостью (2,8%), которые сочетали резистентность к фторхинолонам, обусловленную хромосомными мутациями, и резистентность к другим антимикробным препаратам (АМП), детерминированную генами (*bla*_{TEM-1}, *dfrA7*, *catA1*), расположенными на плазмиде IncHI1. В РФ не выявлены штаммы *S. typhi*, устойчивые к цефалоспорином расширенного спектра и азитромицину. Для того чтобы определить чувствительность штаммов *S. typhi* к фторхинолонам, необходимо определить минимальную подавляющую концентрацию (МПК) ципрофлоксацина (к категории «чувствительный» относят штаммы с МПК ≤0,06 мг/л) либо диаметр зоны задержки роста для диска с пefлоксацином (≥24 мм). Для повышения достоверности скрининга рекомендовано дополнительное использование диска с налидиксовой кислотой. Назначение АМП для эмпирической терапии брюшного тифа должно основываться на локальных данных о чувствительности возбудителя и сопровождаться обязательным определением чувствительности к препаратам выбора с последующей коррекцией тактики антимикробной терапии.

Ключевые слова: брюшной тиф, резистентность, *S. typhi*, фторхинолоны

Для цитирования: Кафтырева Л.А., Егорова С.А., Матвеева З.Н., Макарова М.А., Войтенкова Е.В. Биологические свойства штаммов возбудителя брюшного тифа *Salmonella typhi*, выделенных в Российской Федерации в 2005–2017 гг. Бактериология. 2017; 2(2): 7–13. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-7-13

Biological properties of strains of the causative agent of typhoid fever *Salmonella typhi*, isolated in the Russian Federation in 2005–2017

L.A.Kaftyreva^{1,2}, S.A.Egorova¹, Z.N.Matveeva¹, M.A.Makarova¹, E.V.Voitenkova¹

¹St.-Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russian Federation;

²North-Western State Medical University named by I.I.Mechnikov, Saint-Petersburg, Russian Federation

More than 70% of typhoid fever cases, registered in Russian Federation, are «imported» from the foreign countries. *S. typhi* population is heterogeneous in antimicrobial susceptibility. 89,3% of *S. typhi*, isolated in 2005–2017 in Russian Federation, are resistant to fluoroquinolones due to mutations in 83 and 87 codons of the *gyrA* gene (Asp87Asn, Ser83Tyr, Ser83Phe). In addition, there are *S. typhi* with multidrug resistance (2.8%) that combine fluoroquinolones resistance due to chromosomal mutations and other antimicrobial resistance determined by the genes (*bla*_{TEM-1}, *dfrA7*, *catA1*) located on the IncHI1 plasmid. In the Russian Federation *S. typhi* strains, resistant to expanded spectrum cephalosporins and azithromycin, are not revealed. To determine the fluoroquinolone susceptibility of *S. typhi*, it is necessary to determine the ciprofloxacin MIC or inhibition zone for the pefloxacin. To increase the reliability of screening, additional use of a nalidixic acid disk is recommended. Empiric therapy of typhoid fever should be based on local data of *S. typhi* antimicrobial susceptibility and be accompanied by antimicrobial susceptibility testing to the drugs of choice followed by correction of the therapy.

Keywords: typhoid fever, resistance, *S. typhi*, fluoroquinolones

For citation: Kaftyreva L.A., Egorova S.A., Matveeva Z.N., Makarova M.A., Voitenkova E.V. Biological properties of strains of the causative agent of typhoid fever *Salmonella typhi*, isolated in the Russian Federation in 2005–2017. Bacteriology. 2017; 2(2): 7–13. (In Russian) DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-7-13

Для корреспонденции:

Кафтырева Лидия Алексеевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией кишечных инфекций ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», профессор кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова» Минздрава России

Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14
Телефон: (812) 232-4883; Факс: (812) 232-9217
E-mail: kaffidia@mail.ru

Статья поступила 05.05.2017 г., принята к печати 30.06.2017 г.

For correspondence:

Lidiia A. Kaftyreva, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, Professor of the Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfectology "North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov"

Address: 14 Mira Str., St.Petersburg, 197101, Russian Federation
Phone: (812) 232-4883; Fax: (812) 232-9217
E-mail: kaffidia@mail.ru

The article was received 05.05.2017, accepted for publication 30.06.2017

В настоящее время брюшной тиф как острое инфекционное заболевание и как хроническое носительство возбудителя брюшного тифа (согласно международной классификации болезней 10-го пересмотра относятся в классы A01.0 и Z22.0 соответственно) регистрируется на всех континентах и на глобальном уровне пока не искоренен. Заболевание продолжает оставаться серьезной проблемой здравоохранения в развивающихся странах, где доброкачественные в эпидемиологическом отношении питьевая вода и продукты питания не всегда доступны для населения. В индустриально развитых странах основным фактором риска заражения является географический – пребывание в «эндемичных» регионах по брюшному тифу. В Европе, США, Израиле более 50% всех случаев связаны с туризмом и «завезены» из стран Южной и Юго-восточной Азии: Индии, Непала, Пакистана, Бангладеш, Индонезии и др. [1]. Нередко брюшной тиф завозится рабочими-мигрантами. Исследования, проведенные ВОЗ, показали, что ежегодно регистрируют от 16 до 33 млн новых случаев брюшного тифа и до 500 тыс. летальных исходов. В Российской Федерации в 2008–2017 гг. более 70% зарегистрированных случаев брюшного тифа являлись «завозными» из стран ближнего и дальнего зарубежья [2]. РФ относится к странам с низким уровнем заболеваемости и низким риском инфицирования возбудителем брюшного тифа при посещении туристами. По официальным статистическим данным, динамика заболеваемости брюшным тифом в РФ на протяжении многих десятилетий характеризуется устойчивой тенденцией к снижению. Число случаев заболеваний уменьшилось с 6976 (1970 г.) до 13 (2016 г.). Неблагополучную эпидемическую ситуацию определяли, как правило, социально дезадаптированные группы населения, трудовые мигранты и жители РФ, выезжавшие в регионы с высоким уровнем заболеваемости. Клиническая картина современного брюшного тифа характеризовалась типичными классическими проявлениями болезни: бактериемией, лихорадкой, язвенным поражением лимфатической системы тонкой кишки, циклическим клиническим течением с выраженной интоксикацией, розеолезной сыпью на кожных покровах туловища, гепато- и спленомегалией. Поздняя госпитализация больных служила потенциальной угрозой развития тяжелых осложнений, требующих хирургического вмешательства, и ухудшения прогноза брюшного тифа. Недооценка эпидемиологических и клинических данных затрудняла догоспитальную клиническую диагностику у пациентов с лихорадкой неясного генеза, посещавших страны с теплым и жарким климатом, а также у лиц без определенного места жительства [2, 3].

Не во всех странах имеются национальные системы надзора за брюшным тифом, основанные на целенаправленном бактериологическом обследовании лихорадящих пациентов. Ограниченные возможности лабораторной диагностики в эндемичных странах приводят к неполному выявлению случаев брюшного тифа. Исследования, проведенные на популяционном уровне, демонстрируют широкую вариацию показателей заболеваемости брюшным тифом как на глобальном уровне, так и в пределах отдельных стран [4].

В целях совершенствования организации мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней и реализации на территории РФ Международных медико-

санитарных правил с 2008 г. на базе лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера функционирует референс-центр по мониторингу за брюшным тифом, который был организован согласно приказу №88 Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней».

Цель исследования – изучить чувствительность штаммов *S. typhi*, выделенных на территориях РФ в 2005–2017 гг., к антимикробным препаратам и выявить механизмы резистентности.

Материалы и методы

В референс-центр в 2005–2017 гг. поступили для реидентификации 290 штаммов *S. typhi*, выделенных от заболевших брюшным тифом. Случаи заболевания были зарегистрированы на 19 территориях РФ: в Санкт-Петербурге, Архангельской, Воронежской, Иркутской, Калининградской, Кемеровской, Кировской, Ленинградской, Московской, Новгородской, Орловской, Рязанской, Смоленской, Тульской, Томской, Ульяновской областях, Хабаровске и Еврейской АО, Ханты-Мансийском АО. Культурально-морфологические и ферментативные свойства изучали на отечественных селективных и дифференциально-диагностических питательных средах согласно действующим нормативным документам [5]. Родовую и видовую реидентификацию проводили с использованием бактериологического анализатора Vitek 2 Compact (карта GN, BioMérieux, Франция), рутинных пробирочных тестов, планшетных тест-систем MIKROLATEST (Эрба Рус, РФ). Антигенную структуру определяли в реакции агглютинации на стекле в моновалентных адсорбированных сальмонеллезных сыворотках к O-, H- и Vi-антигенам *S. typhi*, согласно инструкции производителя (СПбНИИВС, Россия). Чувствительность к антимикробным препаратам (АМП) разных групп изучали методами диско-диффузионным (ДДМ) (агар Мюллер-Хинтон, НИЦФ, РФ; диски Oxoid) и градиентной диффузии (E-тесты, BioMérieux, Франция; M.I.C. Evaluator, Oxoid, Великобритания): к ампициллину, цефалоспорином расширенного спектра (ЦРС), хинолонам, хлорамфениколу, ко-тримоксазолу, азитромицину – согласно Клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», 2015 г. (далее – Клинические рекомендации) [6]. Детекцию генов резистентности и плазмид, а также мутаций в генах *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE* провели у 58 штаммов на основе анализа генетических последовательностей, полученных методом полногеномного секвенирования на приборе MiSeq с набором реагентов MiSeq Reagent Kit v2 и Nextera XT (Illumina, США). Геномы анализировали с помощью CLC Genomics Workbench 8.0 (QIAGEN, США). Оценку генетического родства штаммов методом электрофореза в пульсирующем поле (PFGE) проводили по стандартному международному протоколу PulseNet [7].

Результаты и обсуждение

Диагноз брюшного тифа у абсолютного большинства пациентов был подтвержден выделением чистой культуры возбудителя – *S. typhi* из проб биологического материала: крови

(47,4%), испражнений (49,5%), мочи (1,7%) и других (1,4% – секционный материал, выпот из брюшной полости).

Штаммы *S. typhi* хорошо росли на применяемых для *Enterobacteriaceae* простых, селективных и дифференциально-диагностических питательных средах отечественных и зарубежных производителей, представленных на рынке РФ, давая характерные для возбудителя брюшного тифа колонии; имели типичные культурально-ферментативные свойства, отличие от *Salmonella* spp. других сероваров ферментировали с образованием кислоты глюкозу, маннит, мальтозу, сорбит. Отсутствие на перечисленных субстратах газообразования и продукции сероводорода на полиуглеводных средах, а также неспособность утилизировать цитрат в среде Симмонса являются характерными признаками *S. typhi* – возбудителя брюшного тифа. Все штаммы принадлежали к ферментативному биовару 1 (ферментировали ксилозу и не ферментировали арабинозу), за исключением двух, выделенных в Санкт-Петербурге в 2007 и 2014 гг., которые относились к биовару 2 (отрицательная реакция на средах с арабинозой и ксилозой). Ферментативные свойства штаммов *S. typhi*, выделенных на территории РФ, представлены в таблице 1.

Определение серологической группы и сероварианта у штаммов *S. typhi* по наличию O-антигенного комплекса (1, 9, 12), H-d- и Vi-антигенов не вызывало затруднений. Все штаммы (100%) обладали хорошо развитым Vi-антигеном, при этом 16 штаммов (5,5%) содержали Vi-антиген в большом количестве (являлись O-инагглютинабельными – V-форма). В VW-форме находились 94,5% штаммов (агглютинировались в адсорбированных моновалентных сальмонеллезных O 9, 12 сыворотках). Все изученные штаммы были подвижны и имели Hd-антиген. Перечисленные особенности ферментативной характеристики и антигенной структуры не вызывали затруднений при отнесении штаммов к серологическому варианту – *S. typhi*.

Анализ чувствительности/резистентности штаммов к АМП показал, что популяция возбудителя брюшного тифа, зарегистрированного в РФ в 2005–2017 гг., представлена штаммами *S. typhi*, чувствительными к АМП (9,7%) и устойчивыми к различным группам, включая препараты выбора для лечения брюшного тифа (90,3%). Резистентность отмечена к фторхинолонам (89,3%), ко-тримоксазолу (7,6%), ампициллину (2,8%) и хлорамфениколу (2,8%). Устойчивость к цефалоспорином 3–4-го поколения и азитромицину не выявлена.

Штаммы *S. typhi*, чувствительные к АМП, выделены на 9 территориях РФ: в Санкт-Петербурге (2005–2012 гг., 2014 г.), Ленинградской (2009 г., 2014 г.), Московской (2011 г.), Иркутской (2005 г., 2012 г.), Орловской (2009 г.), Воронежской (2015 г.), Новгородской (2009 г.), Ульяновской (2010 г.), Кемеровской (2012 г.) областях.

Устойчивые штаммы представлены несколькими фенотипами резистентности. Большая часть штаммов (82,7%) характеризовалась устойчивостью только к фторхинолонам: низкого (77,2%) и высокого (5,5%) уровня, оставаясь чувствительными к другим АМП. Восемь штаммов (2,8%) были резистентны к ампициллину, хлорамфениколу, ко-тримоксазолу и фторхинолонам, так называемый фенотип MDR (multidrug resistance). В последние два года (2016–2017 гг.) выделены 14 штаммов (4,8%), устойчивых только к ко-тримоксазолу или сочетающих устойчивость к ко-тримоксазолу

Таблица 1. Ферментативные свойства штаммов *S. typhi*, входящих в коллекцию референс-центра (n = 290)

Субстрат	Реакция штаммов	Субстрат	Реакция штаммов
Глюкоза (газ)	–	Цитрат Симмонса	–
Лактоза	–	Ацетат натрия	–
Маннит	+	Адонит	–
Сахароза	–	Раффиноза	–
Продукция индола	–	Салицин	–
Продукция H ₂ S	–*	Реакция Фогеса-Проскауэра	–
Мочевина	–	Метилрот	+
Рамноза	+	Желатин	–
Ксилоза	+99,4%	Малонат натрия	–
Мальтоза	+	Фенилаланин	–
Сорбит	+	β-Галактозидаза	–
Арабиноза	–	d-Тартрат	+
Дульцит	–	Рост с KCN	–
Инозит	–	Мукат	+
Лизин	+	Трегалоза	+
Орнитин	–	Галактуронат	–
Аргинин	+	β-Глюкуронидаза	+

Реакция: положительная «+»; отрицательная «–»;
*на некоторых сериях полиуглеводных сред может отмечаться слабая продукция H₂S.

Таблица 2. Характеристика резистентности к антимикробным препаратам штаммов *S. typhi* (n = 290)

Антимикробные препараты фенотипы резистентности	Резистентные штаммы		
	абс.	%	95% ДИ
1. Фторхинолоны:	240	82,7	78,0–86,7
устойчивость низкого уровня	224	77,2	72,1–81,7
устойчивость высокого уровня	16	5,5	3,4–8,8
2. MDR: ампициллин, хлорамфеникол, ко-тримоксазол, фторхинолоны	8	2,8	1,4–5,3
3. Ко-тримоксазол	3	1,0	0,4–3,0
4. Ко-тримоксазол + фторхинолоны	11	3,8	2,1–6,7
5. Чувствительные	28	9,7	3,8–9,3

и фторхинолонам, в Санкт-Петербурге, Иркутской, Архангельской, Томской областях, Ханты-Мансийском АО (табл. 2).

В популяции возбудителя брюшного тифа, выделенного в 2005–2017 гг. на 19 территориях РФ, 89,3% штаммов характеризовались устойчивостью к фторхинолонам, в том числе 3,8% – в сочетании с устойчивостью к ко-тримоксазолу, 2,8% – в сочетании с MDR-фенотипом.

Для штаммов *Salmonella*, относящихся к «дикий» популяции, минимальная подавляющая концентрация (МПК) ципрофлоксацина не превышает 0,06 мг/л. Устойчивость у штаммов *Enterobacteriaceae*, как правило, развивается в результате мутаций в хромосомных генах *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE*, уровень устойчивости зависит от количества приобретенных мутаций. Первая мутация в кодоне 83 (248-й нуклеотид) или 87 (259-й нуклеотид) гена *gyrA* приводит к повышению МПК ципрофлоксацина до 0,12–0,5 мг/л (так называемая устойчивость низкого уровня). Возникновение последующих мутаций в перечисленных генах повышает МПК ципрофлоксацина до 1,0 мг/л и более (устойчивость высокого уровня). Большая часть штаммов (239; 82,4%) из нашей коллекции характеризовалась устойчивостью низкого уровня к ципрофлоксацину (МПК составляла ряд 0,12; 0,25; 0,5 мг/л), 20 штаммов (6,9%) – устойчивостью высокого уровня (МПК 8,0; 16,0; 32,0 мг/л и более). Анализ данных полногеномного секвенирования 58 устойчивых к фторхинолонам штаммов *S. typhi* выявил различные однонуклеотидные замены в кодонах 83 и 87 гена *gyrA*. Из них у 51 штамма с устойчивостью низкого уровня к фторхиноло-

Таблица 3. Мутации в хромосомном гене *gyrA* штаммов *S. typhi* (n = 58)

МПК ципрофлоксацина	Однонуклеотидные замены			
	G259A	C248A	C248T	G259A+ C248T
	Соответствующие аминокислотные замены			
	Asp87Asn	Ser83Tyr	Ser83Phe	Asp87Asn + Ser83Phe
0,12; 0,25; 0,5 мг/л (n = 51)	44 (75,9%)	6 (10,3%)	1 (1,7%)	0
8,0; 16,0; 32,0 мг/л и более (n = 7)	0	0	0	7 (12,1%)

G – гуанин, C – цитозин, A – аденин, T – тимин, Asp – аспарагиновая кислота, Asn – аспарагин, Ser – серин, Tyr – тирозин, Phe – фенилаланин.

нам идентифицированы три точечные мутации: Asp87Asn (44 штамма), Ser83Tyr (6 штаммов), Ser83Phe (1 штамм). У семи штаммов с устойчивостью высокого уровня выявлено сочетание двух мутаций в гене *gyrA* (Asp87Asn + Ser83Phe) (табл. 3). Нуклеотидная последовательность гена *gyrA* одного штамма депонирована в GenBank (№ KT955017). Мутации в генах *gyrB*, *parC* и *parE* не обнаружены.

Штаммы *S. typhi* с устойчивостью низкого уровня, имевшие одну из мутаций (Asp87Asn, Ser83Tyr, Ser83Phe), вызывали заболевания брюшным тифом в разные годы на всех перечисленных территориях РФ.

Штаммы с устойчивостью высокого уровня, имевшие одновременно две мутации (Asp87Asn + Ser83Phe), были выделены на семи территориях РФ: в Санкт-Петербурге (2007 г., 2013 г.), Калининградской (2011 г., 2012 г.), Смоленской (2012 г.), Воронежской (2014 г., 2017 г.), Кировской (2015 г.), Архангельской (2015 г.) областях и Ханты-Мансийском АО (2016 г.). В четырех случаях установлено, что заболевшие были инфицированы во время поездок в Индию (туристы, иностранные студенты российских ВУЗов).

При выборе фторхинолонов для лечения брюшного тифа основным критерием предполагаемой эффективности является значение МПК цiproфлоксацина. С 2014 г. оценка чувствительности к фторхинолонам штаммов *Salmonella*, вызывающих внекишечные генерализованные инфекции (в том числе *S. typhi*), основана на особых критериях интерпретации, отличающихся от критериев для других *Enterobacteriaceae*. Этот подход отражен в современных рекомендациях Европейского комитета по определению чувствительности микроорганизмов к АМП (EUCAST), Института клинических лабораторных стандартов (CLSI), а также Клинических рекомендациях «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам». Выбор критериев подтвержден многочисленными клиническими данными, свидетельствующими о низкой эффективности фторхинолонов при лечении системных инфекций, вызванных штаммами *Salmonella* с МПК цiproфлоксацина >0,06 мг/л [6, 8, 9]. К категории «чувствительный» относятся штаммы, для которых МПК цiproфлоксацина составляет ≤0,06 мг/л. ДДМ не позволяет достоверно выявлять штаммы *Salmonella* с устойчивостью низкого уровня. По нашим данным, у 20,0% штаммов *Salmonella* с МПК цiproфлоксацина 0,12–0,25 мг/л зона задержки роста превышала 30 мм, и такие штаммы могли быть ошибочно отнесены к категории «чувствительный».

Согласно рекомендациям EUCAST и Клиническим рекомендациям, допускается определять чувствительность штам-

мов *Salmonella* к фторхинолонам ДДМ, используя в качестве индикаторного диска пefлоксацин (5,0 мкг): штамм расценивают как устойчивый ко всем фторхинолонам, если зона задержки роста менее 24 мм. По данным EUCAST, тестирование дисков пefлоксацина (5,0 мкг) различных производителей показало, что не все диски обеспечивали достоверные результаты. Эксперты EUCAST рекомендуют использовать диски, которые дают зону задержки роста для контрольного штамма *E. coli* ATCC 25922 диаметром 29–31 мм [10]. Тем не менее, интерпретация результатов для пefлоксацина несколько затруднена в связи с отсутствием «буферной зоны» (2–3 мм), когда разница в диаметре может быть связана с техническими погрешностями исследования. Хинолоном, наиболее чувствительным к появлению мутаций в генах *gyrA* и *gyrB*, является налидиксовая кислота: даже при единичных мутациях зона задержки роста практически отсутствует, что повышает достоверность скрининга штаммов с устойчивостью низкого уровня. В то же время использование только диска с налидиксовой кислотой (без пefлоксацина) не позволяет выявить редкие плазмидные механизмы резистентности, которые в последнее время встречаются в штаммах *Salmonella* [6, 9].

Многочисленные исследования, проведенные в странах Юго-Восточной и Южной Азии, свидетельствуют о неуклонном росте устойчивости к фторхинолонам в популяции штаммов *S. typhi*. По данным ряда исследователей, в Пакистане в период с 1998 по 2006 гг. доля таких штаммов выросла с 1,6% до 64,1%, а в 2012–2014 гг. 94,4% штаммов *S. typhi* характеризовались устойчивостью высокого уровня к фторхинолонам [11, 12]. Исследования, проведенные в Индии, показали, что в период с 2010 по 2015 гг. более 90% штаммов были резистентны к фторхинолонам, доля штаммов с высоким уровнем резистентности составляла от 25 до 80% [13–17]. В Бангладеш среди штаммов, выделенных в 2005–2014 гг., доля устойчивых к фторхинолонам достигала 94% [18]. В индустриально развитых странах такие штаммы выделяли относительно редко: в США в 2011 г. они составляли 7,3%, в России в 2005–2011 гг. – 2,2 % [4, 19–21].

В нашей коллекции в популяции *S. typhi* доля штаммов с MDR-фенотипом (ампициллин, хлорамфеникол, ко-тримоксазол, фторхинолоны) составляла 2,8%. Такие штаммы выделяли на трех территориях: в Санкт-Петербурге (2005, 2006, 2013, 2015 гг.), Ленинградской (2005, 2006 гг.) и Иркутской (2005, 2006 гг.) областях. Устойчивость к ампициллину (МПК 64,0–>256,0 мг/л) была обусловлена продукцией β-лактамазы широкого спектра TEM-1, МПК ко-тримоксазола и хлорамфеникола превышала 32 мг/л, цiproфлоксацина составляла ряд от 0,12 до 0,5 мг/л (устойчивость низкого уровня). Штаммы с MDR-фенотипом сочетали устойчивость к фторхинолонам, обусловленную хромосомными механизмами (мутациями Asp87Asn и Ser83Tyr в гене *gyrA*), и устойчивость к другим АМП, детерминированную генами (*bla_{TEM-1}*, *dfrA7*, *catA1*), расположенными на плазмиде IncHI1. Появление таких штаммов в Российской Федерации связано с их «завозом» трудовыми мигрантами из стран Средней Азии (Таджикистана и Узбекистана). В 1980–90-х гг. в эндемичных по брюшному тифу странах Юго-Восточной и Южной Азии доля таких штаммов превышала 50,0% [18, 22]. В последние годы на фоне роста устойчивости к фторхинолонам доля MDR-штаммов падает. По данным многоцентрового исследования ВОЗ, про-

веденного в пяти азиатских странах (Китай, Индия, Пакистан, Индонезия, Вьетнам), в 2001–2003 гг. доля штаммов с фенотипом MDR составила 23,0% [23]. Значительное снижение отмечено в Бангладеш и Индии (3,0%) [13, 14, 17, 18]. Высокой остается доля MDR-штаммов в странах Африки: в Нигерии в 2015 г. – около 50%, в Южной Африке – более 20% [24, 25].

Цефалоспорины расширенного спектра (ЦРС) (цефтриаксон, цефотаксим, цефиксим) показали высокую эффективность при лечении сальмонеллезной инфекции. В то же время появление штаммов *Salmonella*, устойчивых к этой группе препаратов, продуцирующих β-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), ограничивает эмпирическое назначение ЦРС. В России частота выделения таких штаммов среди сероваров *S. Virchow*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. newport* по данным различных исследователей составляет 0,2–10,0%, выявлена продукция БЛРС генетической группы СТХ-М и цефалоспориноз AmpC [26–30]. В 2006–2008 гг. устойчивость к цефалоспоринозам 3–4-го поколения отмечена у штаммов *S. typhi* [31–34]. Определение чувствительности штаммов *S. typhi* к ЦРС не вызывает методических затруднений при условии тестирования двух препаратов из этой группы – цефтазидима и цефотаксима (цефтриаксона) и подтверждения продукции БЛРС. Интерпретация результатов проводится согласно Клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», 2015.

В последние годы для лечения инвазивных форм ОКИ, включая брюшной тиф, нередко используют азитромицин – препарат из группы макролидов. Из-за отсутствия в действующих международных рекомендациях критериев интерпретации для азитромицина чувствительность штаммов *S. typhi* к этому препарату можно оценить только ориентировочно, используя «эпидемиологические точки отсечения» (ECOFF – Epidemiological cut-off values) – значения МПК, разделяющие «дикую» популяцию *Salmonella* от штаммов с приобретенными механизмами резистентности. По данным EUCAST, для «диких» штаммов *Salmonella* МПК азитромицина колеблется в диапазоне от 4,0 до 16,0 мг/л (<http://mic.eucast.org/Eucast> 2). Клинические рекомендации предлагают считать чувствительными к азитромицину штаммы, для которых МПК не превышает 16,0 мг/л. Для штаммов *S. typhi* нашей коллекции МПК₉₀ азитромицина составляла 4 мг/л, штаммов с МПК выше 16 мг/л не выявлено.

Изучение филогенетического родства штаммов, выделенных на различных территориях РФ, методом PFGE позволило выявить 11 кластеров, объединяющих близкородственные PFGE-профили. 78,5% штаммов, характеризующихся ведущим фенотипом резистентности (устойчивость низкого уровня к ципрофлоксацину, обусловленная мутацией Asp87Asn), относились к одному кластеру. Такие штаммы ежегодно выделяли от заболевших брюшным тифом на различных территориях РФ. Штаммы с другими фенотипами резистентности, включая чувствительные к АМП, обладали индивидуальными PFGE-профилями.

Заключение

Проведенные исследования показали, что в популяции штаммов *S. typhi*, выделенных в 2005–2017 гг. в Санкт-Петербурге и на 18 других территориях РФ, 89,3% характеризуются

устойчивостью к фторхинолонам – препаратам, активно используемым в последние годы для лечения брюшного тифа, что делает невозможным применение их для эмпирической терапии в нашей стране. В настоящее время для того, чтобы определить чувствительность штаммов *Salmonella*, включая возбудителя брюшного тифа, к фторхинолонам необходимо определить МПК ципрофлоксацина либо диаметр зоны задержки роста, используя диск с пefлоксацином. Возможно дополнительное использование диска с налидиксовой кислотой. Кроме того, популяция возбудителя включает штаммы с множественной устойчивостью к АМП (2,8%), что также осложняет выбор адекватной этиотропной терапии.

Таким образом, назначение АМП для эмпирической терапии брюшного тифа должно основываться на локальных данных о чувствительности возбудителя и сопровождаться обязательным определением чувствительности к препаратам выбора (с учетом методических особенностей тестирования) с последующей коррекцией тактики антимикробной терапии в зависимости от полученных результатов.

Литература

1. Weill F.-X. La fièvre typhoïde n'est plus aussi simple à soigner. *Med. Sci.* 2010; 26:969-75.
2. Жебрун АБ, Парков ОВ, Чхинджерия ИГ, Щербак ЛЛ, Пацюк НА, Афанасьева АН, и др. Эпидемиологические особенности брюшного тифа в современных социально-экономических условиях мегаполиса. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2009;1:27-30.
3. Яковлев АА, Коноваленко АН, Федуняк ИП, Сорокина МД, Першин СС. Клинические проявления брюшного тифа в Санкт-Петербурге. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2009;1:37-41.
4. Kothari A, Pruthi A, Chugh TD. The burden of enteric fever. *J Infect Dev Ctries.* 2008 Aug 30;2(4):253-9. DOI: <https://DOI.org/10.3855/jidc.218>
5. Методические рекомендации. Бактериологическая диагностика брюшного тифа и паратифов А, В и С. Доступно по: <http://docs.cntd.ru/document/1200065159>.
6. Клинические Рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам». Доступно по: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2015.pdf>.
7. Standard operating procedure for Pulsenet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. Available at: http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/PNL05_Ec-Sal-ShigPFGEprotocol.pdf.
8. Clinical Laboratory Standards Institute. Available at: <http://shop.clsi.org/microbiology-documents>
9. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 7.1, valid from 2017-03-10. Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_7.1_Breakpoint_Tables.pdf.
10. Matuschek E, Skov R, Åhman J, Karlsson M, Petersen A, Torpdahl M, Kahlmeter G. EUCAST disk diffusion with pefloxacin 5 µg as screen for fluoroquinolone resistance in *Salmonella* spp. Variation between media, disks and testing sites. Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/EUCAST_Presentations/2014/EUCAST_posters_ECCMID_2014.pdf
11. Ali A, Ali HA, Shah FH, Zahid A, Aslam H, Javed B. Pattern of antimicrobial drug resistance of *Salmonella Typhi* and *Paratyphi A* in a Teaching Hospital in Islamabad. *J Pak Med Assoc.* 2017 Mar;67(3):375-379.
12. Hasan R, Zafar A, Abbas Z, Mahraj V, Malik F, Zaidi A. Antibiotic resistance among *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A in Pakistan (2001–2006). *J Infect Dev Ctries.* 2008 Aug 30;2(4):289-94.

13. Dahiya S, Sharma P, Kumari B, Pandey S, Malik R, Manral N, et al. Characterisation of antimicrobial resistance in *Salmonellae* during 2014–2015 from four centres across India: An ICMR antimicrobial resistance surveillance network report. *Indian J Med Microbiol.* 2017 Jan-Mar;35(1):61-68. DOI: 10.4103/ijmm.IJMM_16_382
14. Das S, Samajpati S, Ray U, Roy I, Dutta S. Antimicrobial resistance and molecular subtypes of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates from Kolkata, India over a 15 years period 1998-2012. *Int J Med Microbiol.* 2017 Jan;307(1):28-36. DOI: 10.1016/j.ijmm.2016.11.006
15. Gandra S, Mojica N, Klein EY, Ashok A, Nerurkar V, Kumari M, et al. Trends in antibiotic resistance among major bacterial pathogens isolated from blood cultures tested at a large private laboratory network in India, 2008–2014. *Int J Infect Dis.* 2016 Sep;50:75-82. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.08.002
16. Gopal M, Elumalai S, Arumugam S, Durairajpandian V, Kannan MA, Selvam E, Seetharaman S. *GyrA* ser83 and *ParC* trp106 Mutations in *Salmonella enterica* Serovar Typhi Isolated from Typhoid Fever Patients. *J Clin Diagn Res.* 2016 Jul; 10(7):DC14-8. DOI: 10.7860/JCDR/2016/17677.8153
17. Sharma P, Dahiya S, Balaji V, Kanga A, Panda P, Das R, et al. Typhoidal *Salmonellae*: Use of Multi-Locus Sequence Typing to Determine Population Structure. *PLoS One.* 2016 Sep 12;11(9):e0162530. DOI: 10.1371/journal.pone.0162530
18. Ahmed D, Nahid MA, Sami AB, Halim F, Akter N, Sadique T, et al. Bacterial etiology of bloodstream infections and antimicrobial resistance in Dhaka, Bangladesh, 2005–2014. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2017 Jan 5;6:2. DOI: 10.1186/s13756-016-0162-z
19. Кафтырева ЛА, Егорова СА, Макарова МА, Матвеева ЗН, Яковлев АА, Шестакова ТИ, и др. Характеристика биологических свойств возбудителя брюшного тифа, зарегистрированного на ряде территорий Российской Федерации в 2005-2007 гг. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2009;1:35-6.
20. Кафтырева ЛА, Егорова СА, Макарова МА, Козырева ВК, Войтенкова ЕВ, Матвеева ЗН, и др. Особенности брюшного тифа в Российской Федерации. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии.* 2012;21:101-8.
21. National Antimicrobial resistance Monitoring System. 2014 Human Isolates Surveillance Report. Available at: <https://www.cdc.gov/narms/pdf/2014-annual-report-narms-508c.pdf>
22. Karamat K, Butt T, Hannan A, Islam N, Hussain T, Qureshi A, et al. Problem of multi-drug resistant typhoid fever in Rawalpindi/Islamabad area. *Pak Arm Forces Med. J.* 1996;46:48-54.
23. Ochiai RL, Acosta CJ, Danovaro-Holliday MC, Baiqing D, Bhattacharya SK, Agtini MD, et al. A study of typhoid fever in five Asian countries: disease burden and implications for controls. *Bull World Health Organ.* 2008;86(4):260-8.
24. Wong VK, Holt KE, Okoro C, Baker S, Pickard DJ, et al.; International Typhoid Consortium. Molecular Surveillance Identifies Multiple Transmissions of Typhoid in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(9):e0004781. DOI:10.1371/journal.pntd.0004781
25. Keddy KH, Sooka A, Smith AM, Musekiwa A, Tau NP, Klugman KP, et al. Typhoid Fever in South Africa in an Endemic HIV Setting. *PLoS ONE.* 2016;11(10):e0164939. DOI:10.1371/journal.pone.0164939
26. Егорова СА, Макарова МА, Забровская АВ, Матвеева ЗН, Сужаева ЛВ, Войтенкова ЕВ, Кафтырева ЛА. Многообразие механизмов антибиотикорезистентности сальмонелл. *Инфекция и иммунитет.* 2011;1(4):303-10.
27. Кафтырева ЛА, Егорова СА, Кожухова ЕА, Макарова МА, Козлова НС, Матвеева ЗН, и др. Резистентность энтеробактерий к антимикробным препаратам выбора при лечении острых кишечных инфекций. *Казанский медицинский журнал.* 2009;90(5):699-704.
28. Кафтырева ЛА, Егорова СА, Макарова МА, Колосовская ЕН, Дарына МГ. Распространенность и характеристика БЛРС-продуцирующих энтеробактерий – возбудителей различных инфекционных заболеваний. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии.* 2010;17:124-9.
29. Козлова НС, Гладин ДП, Баранцевич ЕП. Характеристика бета-лактамаз антибиотикорезистентных штаммов некоторых патогенных бактерий. *Профилактическая и клиническая медицина.* 2011;3:365-9.
30. Козырева ВК, Эйдельштейн МВ, Тапальский ДВ, Азизов ИС, Романов АВ, Козлов РС. Клональное распространение CTX-M-5-продуцирующих нозокоммиальных штаммов *Salmonella Typhimurium* в России, Беларуси и Казахстане. *KMAX.* 2012;14(1):38-50.
31. Akinyemi KO, Iwalokun BA, Alafe OO, Mudashiru SA, Fakorede C. bla CTX-M-I group extended spectrum beta lactamase-producing *Salmonella typhi* from hospitalized patients in Lagos, Nigeria. *Infect Drug Resist.* 2015 May 11;8:99-106. DOI: 10.2147/IDR.S78876
32. González-López J, Piedra-Carrasco N, Salvador F, Rodríguez V, Sánchez-Montalvá A, Planes AM, et al. ESBL-producing *Salmonella enterica* serovar Typhi in traveler returning from Guatemala to Spain. *Emerg Infect Dis.* 2014 Nov; 20(11):1918-20. DOI: 10.3201/eid2011.140525
33. Hendriksen RS, Leekitcharoenphon P, Mikoleit M, Jensen JD, Kaas RS, Roer L, et al. Genomic dissection of travel-associated extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar typhi isolates originating from the Philippines: a one-off occurrence or a threat to effective treatment of typhoid fever? *J Clin Microbiol.* 2015 Feb;53(2):677-80. DOI: 10.1128/JCM.03104-14
34. Pokharel BM, Koirala J, Dahal RK, Mishra SK, Khadga PK, Tuladhar NR. Multidrug-resistant and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Salmonella enterica* (serotypes Typhi and Paratyphi A) from blood isolates in Nepal: surveillance of resistance and a search for newer alternatives. *Int J Infect Dis.* 2006 Nov;10(6):434-8. DOI: 10.1016/j.ijid.2006.07.001

References

1. Weill F.-X. La fièvre typhoïde n'est plus aussi simple à soigner. *Med. Sci.* 2010;26:969-75.
2. Zhebrun AB, Parkov OV, Chkhidzheria IG, Shcherbak LL, Patsyuk NA, Afanasyeva AN, et al. The epidemiological features of typhoid under the present socioeconomic conditions of a megapolis. *Epidemiology and Infectious Diseases.* 2009;1:27-30. (In Russian).
3. Yakovlev AA, Kovakenko AN, Fedunyak IP, Sorokina MD, Pershin SS. The clinical manifestations of typhoid in Saint Petersburg. *Epidemiology and Infectious Diseases.* 2009;1:37-41. (In Russian).
4. Kothari A, Pruthi A, Chugh TD. The burden of enteric fever. *J Infect Dev Ctries.* 2008 Aug 30;2(4):253-9. DOI: <https://doi.org/10.3855/jidc.218>
5. Methodical recommendations. Bacteriological diagnosis of typhoid and paratyphoid A, b and C. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200065159>. (In Russian).
6. Clinical Guidelines "Definition of sensitivity of microorganisms to antimicrobial agents". Available at: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrecdsma2015.pdf>. (In Russian).
7. Standard operating procedure for Pulsenet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. Available at: http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/PNL05_Ec-Sal-ShigPFGEprotocol.pdf.
8. Clinical Laboratory Standards Institute. Available at: <http://shop.clsi.org/microbiology-documents>
9. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 7.1, valid from 2017-03-10. Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_7.1_Breakpoint_Tables.pdf.
10. Matuschek E, Skov R, Åhman J, Karlsson M, Petersen A, Torpdahl M, Kahlmeter G. EUCAST disk diffusion with pefloxacin 5 µg as screen for fluoroquinolone resistance in *Salmonella* spp. Variation between media, disks and testing sites. Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/EUCAST_Presentations/2014/EUCAST_posters_ECCMID_2014.pdf
11. Ali A, Ali HA, Shah FH, Zahid A, Aslam H, Javed B. Pattern of antimicrobial drug resistance of *Salmonella Typhi* and *Paratyphi A* in a Teaching Hospital in Islamabad. *J Pak Med Assoc.* 2017 Mar;67(3):375-379.

12. Hasan R, Zafar A, Abbas Z, Mahraj V, Malik F, Zaidi A. Antibiotic resistance among *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A in Pakistan (2001–2006). *J Infect Dev Ctries*. 2008 Aug 30;2(4):289-94.
13. Dahiya S, Sharma P, Kumari B, Pandey S, Malik R, Manral N, et al. Characterisation of antimicrobial resistance in *Salmonellae* during 2014–2015 from four centres across India: An ICMR antimicrobial resistance surveillance network report. *Indian J Med Microbiol*. 2017 Jan-Mar;35(1):61-68. DOI: 10.4103/ijmm.IJMM_16_382
14. Das S, Samajpati S, Ray U, Roy I, Dutta S. Antimicrobial resistance and molecular subtypes of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates from Kolkata, India over a 15 years period 1998-2012. *Int J Med Microbiol*. 2017 Jan;307(1):28-36. DOI: 10.1016/j.ijmm.2016.11.006
15. Gandra S, Mojica N, Klein EY, Ashok A, Nerurkar V, Kumari M, et al. Trends in antibiotic resistance among major bacterial pathogens isolated from blood cultures tested at a large private laboratory network in India, 2008–2014. *Int J Infect Dis*. 2016 Sep;50:75-82. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.08.002
16. Gopal M, Elumalai S, Arumugam S, Durairajpandian V, Kannan MA, Selvam E, Seetharaman S. GyrA ser83 and ParC trp106 Mutations in *Salmonella enterica* Serovar Typhi Isolated from Typhoid Fever Patients. *J Clin Diagn Res*. 2016 Jul;10(7):DC14-8. DOI: 10.7860/JCDR/2016/17677.8153
17. Sharma P, Dahiya S, Balaji V, Kanga A, Panda P, Das R, et al. Typhoidal *Salmonellae*: Use of Multi-Locus Sequence Typing to Determine Population Structure. *PLoS One*. 2016 Sep 12;11(9):e0162530. DOI: 10.1371/journal.pone.0162530
18. Ahmed D, Nahid MA, Sami AB, Halim F, Akter N, Sadique T, et al. Bacterial etiology of bloodstream infections and antimicrobial resistance in Dhaka, Bangladesh, 2005–2014. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017 Jan 5;6:2. DOI: 10.1186/s13756-016-0162-z
19. Kaftyreva LA, Yegorova SS, Makarova MA, Matveyeva ZN, Yakovlev AA, Shestakova TI, et al. Characteristics of the biological properties of the typhoid causative organism registered in a number of areas of the Russian Federation in 2005-2007. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2009;1:35-6. (In Russian).
20. Kaftyreva LA, Egorova SA, Kozireva VK, Makarova MA, Voitenkova EV, Matveeva ZN, et al. Features of typhoid fever in the Russian Federation. *Dal'nevostochnyi zhurnal infektsionnoi patologii*. 2012;21:101-8. (In Russian).
21. National Antimicrobial resistance Monitoring System. 2014 Human Isolates Surveillance Report. Available at: <https://www.cdc.gov/narms/pdf/2014-annual-report-narms-508c.pdf>
22. Karamat K, Butt T, Hannan A, Islam N, Hussain T, Qureshi A, et al. Problem of multi-drug resistant typhoid fever in Rawalpindi/Islamabad area. *Pak Arm Forces Med J*. 1996;46:48-54.
23. Ochiai RL, Acosta CJ, Danovaro-Holliday MC, Baiqing D, Bhattacharya SK, Agtini MD, et al. A study of typhoid fever in five Asian countries: disease burden and implications for controls. *Bull World Health Organ*. 2008;86(4):260-8.
24. Wong VK, Holt KE, Okoro C, Baker S, Pickard DJ, et al.; International Typhoid Consortium. Molecular Surveillance Identifies Multiple Transmissions of Typhoid in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(9):e0004781. DOI:10.1371/journal.pntd.0004781
25. Keddy KH, Sooka A, Smith AM, Musekiwa A, Tau NP, Klugman KP, et al. Typhoid Fever in South Africa in an Endemic HIV Setting. *PLoS ONE*. 2016;11(10):e0164939. DOI:10.1371/journal.pone.0164939
26. Egorova SA, Makarova MA, Zbrovskaya AV, Matveeva ZN, Suzhaeva LV, Voitenkova EV, Kaftyreva LA. Mnogoobrazie mekhanizmov antibiotikorezistentnosti sal'monell. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2011;1(4):303-10. (In Russian).
27. Koftyreva LA, Egorova SA, Kozhukhova EA, Makarova MA, Kozlova NS, Matveeva ZN, et al. Resistance of enterobacteria to antimicrobial drugs of choice in the treatment of acute intestinal infections. *Kazan Medical Journal*. 2009; 90(5):699-704. (In Russian).
28. Kaftyreva LA, Egorova SA, Makarova MA, Kolosovskaya EN, Dariena MG. Prevalence and characterization of ESBL-producing enterobacteriaceae causing different infection diseases. *Dal'nevostochnyi zhurnal infektsionnoi patologii*. 2010;17:124-9. (In Russian).
29. Kozlova NS, Gladin DP, Barantsevich EP. Kharakteristika beta-laktamaz antibiotikorezistentnykh shtammov nekotorykh patogennykh bakterii. *Preventive and Clinical Medicine*. 2011;3:365-9. (In Russian).
30. Kozyreva VK, Edelstein MV, Tapalski DV, Azizov IS, Romanov AV, Kozlov RS. Clonal dissemination of CTX-M-5-producing nosocomial strains of *Salmonella* Typhimurium in Russia, Belarus, and Kazakhstan. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;14(1):38-50. (In Russian).
31. Akinyemi KO, Iwalokun BA, Alafe OO, Mudashiru SA, Fakorede C. bla CTX-M-I group extended spectrum beta lactamase-producing *Salmonella typhi* from hospitalized patients in Lagos, Nigeria. *Infect Drug Resist*. 2015 May 11;8:99-106. DOI: 10.2147/IDR.S78876
32. González-López J, Piedra-Carrasco N, Salvador F, Rodríguez V, Sánchez-Montalvá A, Planes AM, et al. ESBL-producing *Salmonella enterica* serovar Typhi in traveler returning from Guatemala to Spain. *Emerg Infect Dis*. 2014 Nov; 20(11):1918-20. DOI: 10.3201/eid2011.140525
33. Hendriksen RS, Leekitcharoenphon P, Mikoleit M, Jensen JD, Kaas RS, Roer L, et al. Genomic dissection of travel-associated extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar typhi isolates originating from the Philippines: a one-off occurrence or a threat to effective treatment of typhoid fever? *J Clin Microbiol*. 2015 Feb;53(2):677-80. DOI: 10.1128/JCM.03104-14
34. Pokharel BM, Koirala J, Dahal RK, Mishra SK, Khadga PK, Tuladhar NR. Multidrug-resistant and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Salmonella enterica* (serotypes Typhi and Paratyphi A) from blood isolates in Nepal: surveillance of resistance and a search for newer alternatives. *Int J Infect Dis*. 2006 Nov;10(6):434-8. DOI: 10.1016/j.ijid.2006.07.001

Информация об авторах:

Егорова Светлана Александровна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»
Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14
Телефон/факс: (812) 232-4883
E-mail: egorova72@mail.ru

Матвеева Зоя Николаевна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»
Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14
Телефон/факс: 8(812) 232-4883
E-mail: Pasteur@LK14290.spb.edu

Мakarova Мария Александровна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»
Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14
Телефон/факс: (812) 232-4883
E-mail: makmaria@mail.ru

Voitenkova Елена Владимировна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»
Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14
Телефон/факс: (812) 232-4883
E-mail: makmaria@mail.ru

Information about authors:

Svetlana A. Egorova, PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology
Address: 14 Mira Str., St. Petersburg, 197101, Russian Federation
Phone: (812) 232-4883
E-mail: Egorova72@mail.ru

Zoya N. Matveeva, PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology
Address: 14 Mira Str., St. Petersburg, 197101, Russian Federation
Phone: (812) 232-4883
E-mail: Pasteur@LK14290.spb.edu

Maria A. Makarova, PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology
Address: 14 Mira Str., St. Petersburg, 197101, Russian Federation
Phone: (812) 232-4883
E-mail: Makmaria@mail.ru

Elena V. Voitenkova, PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology
Address: 14 Mira Str., St. Petersburg, 197101, Russian Federation
Phone: (812) 232-4883

Сполиготипирование штаммов микобактерий туберкулеза, выделенных от ВИЧ-положительных и ВИЧ-отрицательных больных туберкулезом Свердловской области

Г.В.Панов¹, С.Н.Андреевская², Е.Е.Ларионова², Т.Г.Смирнова²,
А.И.Цветков¹, А.Э.Эргешов², Л.Н.Черноусова²

¹ГБУЗ СО «Противотуберкулезный диспансер», Екатеринбург, Российская Федерация;

²ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза», Москва, Российская Федерация

С целью анализа генотипической структуры популяций *M. tuberculosis*, выделяемых ВИЧ-положительными (группа I) и ВИЧ-негативными (группа II) больными туберкулезом Свердловской области, было проведено сполиготипирование 308 штаммов *M. tuberculosis* (158 штаммов группы I, 150 штаммов группы II). Показано, что во всей изученной популяции штаммов преобладали штаммы генотипа Beijing, которые, однако, достоверно чаще встречались у штаммов группы I. Также группа I характеризовалась большей степенью кластеризации штаммов и редкой встречаемостью орфанных штаммов и штаммов-синглетонов. Все вместе описанные факты свидетельствуют в пользу теории развития туберкулеза у ВИЧ-инфицированных лиц вследствие суперинфицирования, а не эндогенной реактивации. Повышенная частота встречаемости штаммов линии Beijing, обладающих повышенной трансмиссивностью и ассоциированных с лекарственной резистентностью, позволяет говорить о том, что ВИЧ-инфицированные больные туберкулезом представляют собой эпидемически значимую группу, что диктует необходимость разработки специальных мероприятий, направленных на предупреждение распространения особо опасных штаммов *M. tuberculosis*.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, сполиготипирование, линия Beijing, ВИЧ

Для цитирования: Панов Г.В., Андреевская С.Н., Ларионова Е.Е., Смирнова Т.Г., Цветков А.И., Эргешов А.Э., Черноусова Л.Н. Сполиготипирование штаммов микобактерий туберкулеза, выделенных от ВИЧ-положительных и ВИЧ-отрицательных больных туберкулезом Свердловской области. Бактериология. 2017; 2(2): 14–19. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-14-19

Spoligotyping of *M. tuberculosis* strains, isolated from HIV-positive and HIV-negative TB patients of Sverdlovsk region

G.V.Panov¹, S.N.Andreevskaya², E.E.Larionova², T.G.Smirnova²,
A.I.Tsvetkov¹, A.E.Ergeshov², L.N.Chernousova²

¹Sverdlovsk region TB dispensary Ekaterinburg, Russian Federation;

²Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

In order to analyse the genotypic structure of *M. tuberculosis* populations, isolated from HIV-positive (group I) and HIV-negative (group II) TB patients in Sverdlovsk region, spoligotyping of 308 *M. tuberculosis* strains (158 strains of group I, 150 of group II) was pursued. It was indicated that Beijing genotype strains prevailed among the whole studied population of strains, however, the Beijing genotype strains were significantly more frequent in strains of group I. Also group I was characterized by a greater degree of strains clustering and a rare occurrence of orphan strains and singleton strains. All the facts taken together say for the theory of tuberculosis development in HIV-infected individuals as a result of superinfection, rather than endogenous reactivation. The increased incidence of the Beijing line strains with higher transmissibility and associated with drug resistance suggests that HIV-infected TB patients amount to a relevant epidemic group that dictates the need for special measures to prevent the spread of highly dangerous strains of *M. tuberculosis*.

Keywords: *M.tuberculosis*, spoligotyping, Beijing line, HIV

For citation: Panov G.V., Andreevskaya S.N., Larionova E.E., Smirnova T.G., Tsvetkov A.I., Ergeshov A.E., Chernousova L.N. Spoligotyping of *M. tuberculosis* strains, isolated from HIV-positive and HIV-negative TB patients of Sverdlovsk region. Bacteriology. 2017; 2(2): 14–19. (In Russian) DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-14-19

Для корреспонденции:

Панов Григорий Валентинович, заведующий отделом молекулярно-генетических методов исследований лаборатории этиологической диагностики ГБУЗ СО «Противотуберкулезный диспансер»

Адрес: 620142, Екатеринбург, ул. Чапаева, 9

Телефон: (343) 220-2100

E-mail: grigoriy31183@yandex.ru

Статья поступила 12.05.2017 г., принята к печати 30.06.2017 г.

For correspondence:

Grigory V. Panov, Head of the Department of Molecular-genetic Methods of Research in Etiologic Diagnosis Laboratory, Sverdlovsk region TB dispensary

Address: 9, Chapayeva Str., Ekaterinburg, 620142, Russian Federation

Phone: (343) 220-2100

E-mail: grigoriy31183@yandex.ru

The article was received 12.05.2017, accepted for publication 30.06.2017

Туберкулез (ТБ), сочетанный с ВИЧ-инфекцией, в последние годы приобрел большое значение для глобального здравоохранения. По данным ВОЗ, у лиц, инфицированных ВИЧ, активный ТБ развивается в 26 раз чаще, чем у ВИЧ-негативных. Начиная с 1980-х гг., эпидемия ВИЧ привела к серьезному росту заболеваемости ТБ и смертности от ТБ во многих странах, особенно в странах Южной и Восточной Африки (74% всех случаев ассоциированного с ВИЧ ТБ). По данным на конец 2014 г., в мире из 9,6 млн больных ТБ 1,2 млн (12%) являются ВИЧ-позитивными [1].

В РФ показатель распространенности коинфекции ТБ/ВИЧ имеет тенденцию к росту и с 2009 г. увеличился приблизительно в 2 раза (с 10,9 случаев на 100 тыс. населения в 2009 г. до 19,7 на 100 тыс. населения в 2015 г.). Лидирующее место в стране по абсолютному числу больных с сочетанной инфекцией ТБ/ВИЧ занимает Свердловская область. По данным на конец 2015 г. в регионе было зарегистрировано 2915 человек с коинфекцией, что составляет около 10% от числа всех больных с коинфекцией в РФ (28 821 человек) [1, 2]. Возможно, лидирующее положение Уральского ФО среди регионов с коинфекцией ТБ/ВИЧ стало причиной того, что в 2015 г. году там, в единственном по стране регионе, был отмечен рост показателя «заболеваемость туберкулезом» на 4,3% (с 75,1 до 78,3 на 100 тыс. населения) [2]. Таким образом, ВИЧ-ассоциированный ТБ имеет большое значение для здравоохранения РФ и в отсутствие адекватных мер контроля может привести к ухудшению эпидемических показателей по ТБ в стране.

Считается, что распространению туберкулеза у больных ВИЧ способствуют высокая инфицированность населения микобактериями туберкулезного комплекса, идентичность групп риска по обеим инфекциям (больные наркоманией, заключенные, лица, ведущие асоциальный образ жизни), а также высокая степень иммуносупрессии [3–6]. Однако единого мнения о путях развития ТБ у ВИЧ-инфицированных – реактивация из очагов ранее перенесенного туберкулеза или суперинфицирование – до сих пор не существует, влияние ВИЧ-инфекции на эпидемическую опасность пациентов также до сих пор точно неизвестно [7–10].

Учитывая, что на степень эпидемиологической опасности различных категорий больных влияет их способность передавать возбудителя в популяции, важно знать генотип возбудителя, т.к. для некоторых генотипов описаны специфические биологические свойства, повышающие их трансмиссивность и дающие им преимущество для выживания в макроорганизме [11–13]. При исследовании молекулярно-эпидемиологических особенностей штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных ТБ с ВИЧ-инфекцией, разными группами исследователей были получены противоречивые результаты: ряд исследователей не выявили различий в распространении конкретных генотипических линий *M. tuberculosis* среди больных ТБ с ВИЧ-инфекцией по сравнению с общей популяцией больных ТБ [14, 15], в других работах были показаны ассоциации с определенным генотипом *M. tuberculosis*, выделенных от ВИЧ-инфицированных больных [16]. Таким образом, несмотря на широкое распространение сочетанного заболевания ТБ/ВИЧ, штаммы *M. tuberculosis* от этой категории пациентов до сих пор остаются мало охарактеризованными.

Цель работы: анализ генотипов штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от ВИЧ-положительных и ВИЧ-отрицательных больных ТБ.

Материалы и методы

Объект исследования – 308 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от 308 впервые выявленных ранее не леченных больных туберкулезом. В группу I включено 158 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных с коинфекцией ТБ/ВИЧ, в группу II – 150 штаммов от ВИЧ-негативных больных ТБ. Все пациенты проходили обследование в диспансерах ГБУЗ Свердловской области «Противотуберкулезный диспансер» г. Екатеринбурга. 165 больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ в стадии СПИД (источник штаммов группы I), были направлены в ГБУЗ Свердловской области «Противотуберкулезный диспансер» для уточнения диагноза после обследования в ГБУЗ Свердловской области «Свердловский областной центр профилактики и борьбы со СПИД» г. Екатеринбурга. 166 ВИЧ-негативных больных ТБ (источник штаммов группы II) отбирали параллельно из числа пациентов, обратившихся за помощью в диспансеры ГБУЗ Свердловской области «Противотуберкулезный диспансер» г. Екатеринбурга.

Сполиготипирование. Генотипирование выделенных культур проводили по методике сполиготипирования, оценивающей особенности структуры DR-локуса хромосомы *M. tuberculosis* с применением набора реагентов для сполиготипирования (Isogen Bioscience BV, Нидерланды) в соответствии с инструкцией производителя. Результаты сполиготипирования оценивали визуально по наличию или отсутствию каждого из 43 детектируемых уникальных участков (спейсоров). Идентификация сполигопрофилей – определение международного варианта сполиготипа (SIT – Spoligotype International Type) и принадлежности к штаммовой линии была проведена согласно международной базе данных SITVITWEB (Institut Pasteur de la Guadeloupe), которая на момент проведения исследования содержала информацию о 58 187 штаммах *M. tuberculosis* из 102 стран и о 7104 сполигопрофилях, из которых 2774 присвоен международный вариант сполиготипов SIT. Остальные 4357 профилей встречались однократно и числились в базе как орфанные (уникальные) штаммы [17].

Чтобы сгруппировать штаммы согласно их филогении, сполигопрофили были проанализированы с использованием метода попарного внутригруппового невзвешенного среднего (UPGMA), позволяющего построить дендрограмму с привлечением интернет-ресурса www.miru-vnrplus.org [18].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного пакета BioStat v5 (Analyst Soft, США). Для оценки значимых различий между группами использовали критерий хи-квадрат (χ^2) для таблиц сопряженности 2 × 2; статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате сполиготипирования 308 штаммов *M. tuberculosis* было выявлено 59 профилей гибридизации, из которых 42 встречались однократно, а 17 – два и более раз,

т.е. характеризовали кластеры штаммов. Всего в состав кластеров входило 266/308 (86,36%) штаммов *M. tuberculosis* (с числом штаммов в кластере от 2 до 202). Согласно SITVITWEB, 295/308 (95,78%) штаммов были объединены в 46 SIT, из которых 7 SIT относились к категории U (unknown), т.е. не были отнесены ни к одной штаммовой линии, другие 39 SIT были классифицированы в 7 штаммовых линий: Beijing/Beijing-like, H, T, LAM, MANU, S, X, а 13 (4,22%) штаммов встречались однократно и были отнесены к орфанным.

Филогенетическое дерево изученной региональной популяции штаммов *M. tuberculosis* представлено на рисунке.

Дендрограмма имела две главные ветви: ветвь 1 включала в себя 7 спוליгопрофилей, остальные выявленные в исследовании спוליгопрофили располагались на ветви 2. На основании анализа филогенетических связей, установленных с применением алгоритма UPGMA, и сходства профилей гибридизации, было выделено 7 основных линий *M. tuberculosis* (см. рис. 1).

Первую линию составляли штаммы *M. tuberculosis*, которые имели профили гибридизации с минимальным числом делетированных спейсоров: обязательно отсутствовали спейсоры 33–36 и выявлялись единичные дисперсные делеции спейсоров на участке 1–32. Группа была представлена в основном вариантами сублинии T1.

Следующую линию составляли штаммы *M. tuberculosis*, представленные вариантами сублинии LAM9, базовый спוליгопрофиль которых характеризовался отсутствием спейсоров 21–24 и 33–36.

Третью линию составляли штаммы с отсутствием спейсоров 29–31 и 33–36, что является характерным для сублинии H4-Ural, эндемичной для Уральского региона.

В четвертую линию входили штаммы с базовым профилем, характеризующимся отсутствием спейсоров 26–31 и 33–36 и были представлены вариантами H1.

Вошедшие в состав следующей линии штаммы характеризовались профилями с отсутствием спейсоров 4–6,

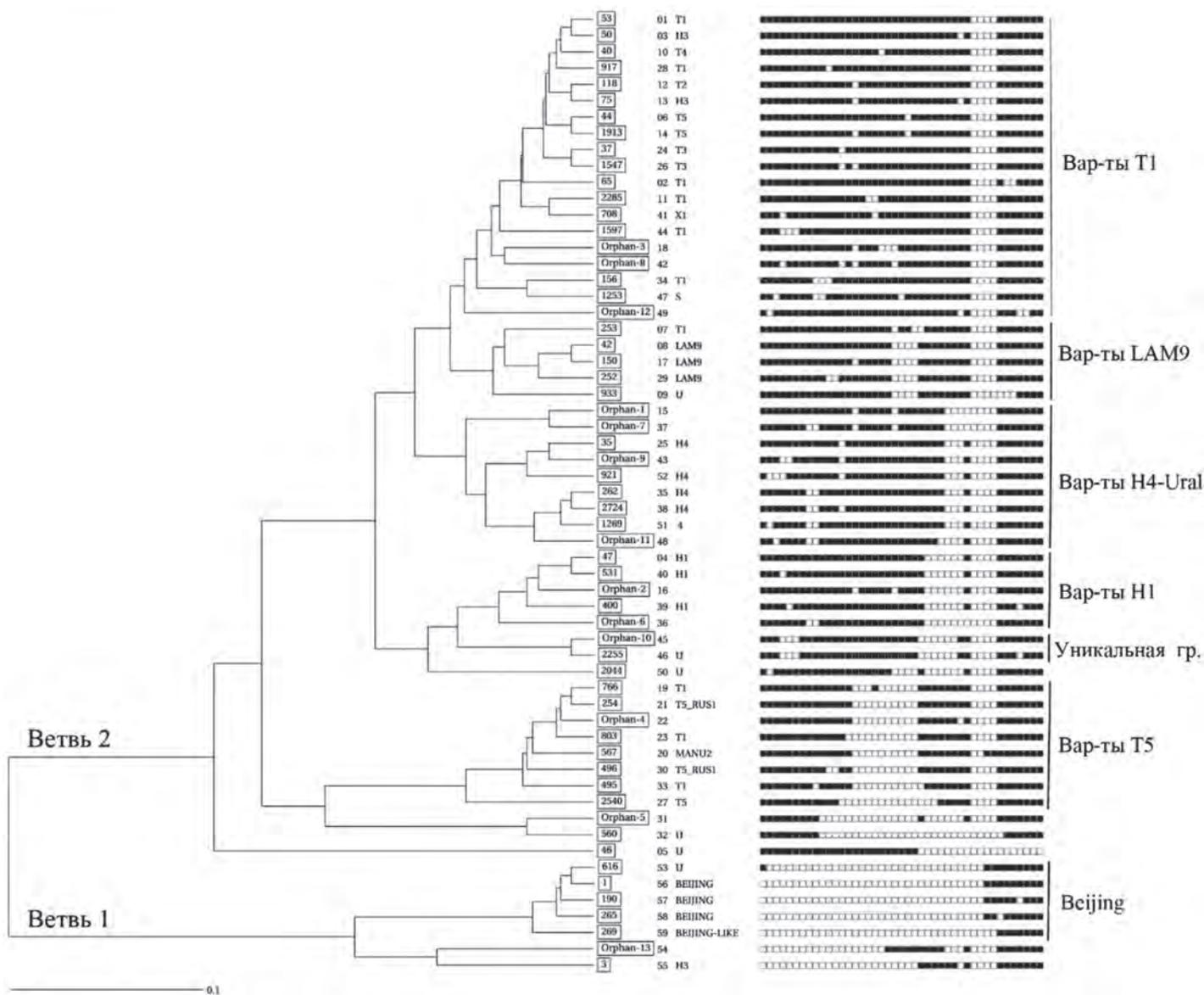


Рисунок. Дендрограмма спוליгопрофилей, построенная с использованием алгоритма UPGMA (www.miru-vnrplus.org). В рамку заключен SIT спוליгопрофиля. 1-й столбик цифр после рамки – порядковый номер спוליгопрофиля при внесении в программу. 2-й столбик – сублиния согласно SITVITWEB.

лись в группе II (6 штаммов), чем в группе I (1 штамм). Редкие орфанные штаммы также чаще встречались в группе II (9 штаммов против 4 в группе I).

Отдельного упоминания заслуживает факт выявления филогенетической линии, в состав которой входят два штамма, один из которых был отнесен в базе данных SITVITWEB к орфанному, а другой, хоть и имел SIT, но не принадлежал ни к одной известной штаммовой линии, что свидетельствует о том, что штаммы этой линии достаточно редки, мало трансмиссивны и обособлены от общей популяции. Наличие такого клонального комплекса, состоящего из двух штаммов, выделенных от больных ТБ, сочетанным с ВИЧ, вероятно, отражает возможность передачи малотрансмиссивных клонов именно среди этой категории больных вследствие особенности их иммунного статуса. Аналогичное утверждение справедливо и в отношении штамма SIT2450, который, при редкой встречаемости в РФ и в мире, в нашем исследовании относился к основным SIT и был выделен только у ВИЧ-инфицированных (см. табл. 1).

Таким образом, изученная региональная популяция штаммов характеризовалась преобладанием характерных для Азии штаммовых вариантов, включая Beijing. Штаммы этого генотипа преобладали во всей изученной популяции, однако достоверно чаще встречались в группе штаммов, выделенных от ВИЧ-инфицированных больных ТБ.

Также штаммы группы I были более кластеризованы и, следовательно, характеризовались более высокой активностью трансмиссии, чем штаммы, выделенные от больных ТБ с отрицательным ВИЧ-статусом. Редкая встречаемость орфанных штаммов и штаммов-синглетонов и высокая степень кластеризации в группе штаммов, выделенных от больных с коинфекцией, свидетельствует в пользу теории развития ТБ у ВИЧ-инфицированных лиц вследствие суперинфицирования, а не эндогенной реактивации. Повышенная частота встречаемости высокотрансмиссивных штаммов линии Beijing, часто ассоциированных с лекарственной резистентностью, позволяет говорить о том, что ВИЧ-инфицированные больные ТБ представляют собой эпидемически значимую группу, что диктует необходимость разработки специальных мероприятий, направленных на предупреждение распространения особо опасных штаммов.

Литература

1. World Health Organization: Global tuberculosis report 2015. WHO/HTM/TB/2015.22. Geneva, 2015, 204 p.
2. Нечаева ОБ. Ситуация по туберкулезу в России в 2015 году. Федеральный Центр мониторинга противодействия распространению туберкулеза. Доступно по: <http://mednet.ru/ru/czentr-monitoringa-tuberkuleza/o-czentre.html>
3. Бабаева ИЮ, Демихова ОВ, Кравченко АВ. Диссеминированный туберкулез легких у больных ВИЧ-инфекцией. Под ред. В.В.Ерохина. М.: Нью ТЕРРА, 2010, 164 с.
4. Покровский ВВ. Почему ВИЧ/СПИД в России вновь на подъеме? Шаги профессионала. 2007;3:29-32.
5. Page KR, Chaisson R, Godfrey-Faussett P. Tuberculosis-HIV coinfection: epidemiology, clinical aspects, and interventions. In: M.Raviglione (Ed), Reichman and Hershfield's Tuberculosis. New York: Informa healthcare, 2006, pp. 371-416.
6. Scholten JN, Driver CR, Munsiff SS. Effectiveness of isoniazid treatment for latent tuberculosis infection among human immunodeficiency virus (HIV)-infected and

HIV-negative injection drug users in methadone programs. Clin Infect Dis. 2003;37:1686-92.

7. Блум БР. Туберкулез. Патогенез, защита, контроль. Под ред. Б.Р.Блум. М.: Медицина, 2002, 678 с.
8. Daley CL, Small PM, Schechter GF, Schoolnik GK, McAdam RA, Jacobs WR Jr, Hopewell PC. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. N Engl J Med. 1992;326:231-5.
9. Загдын ЗМ, Ковеленов АЮ, Шабалин ВН, Хаймер Р. Поздно выявленный туберкулез среди больных, инфицированных и не инфицированных ВИЧ, в Ленинградской области и причины их смерти. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2010;2(1):70-7.
10. Зимица ВН, Кравченко АВ, Викторова ИБ. Эпидемиология, течение и особенности лечения туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией. Медицина в Кузбассе. 2011;10(3):6-13.
11. Андреевская СН, Черноусова ЛН, Земскова ЗС, Ларионова ЕЕ, Смирнова ТГ. Биологические свойства штаммов *M. tuberculosis* кластера W. Проблемы туберкулеза и болезни легких. 2008;85(10):45-50.
12. Андреевская СН, Черноусова ЛН, Смирнова ТГ, Ларионова ЕЕ, Кузьмин АВ. Трансмиссия штаммов микобактерий туберкулеза, обусловленная миграционными процессами в Российской Федерации (на примере миграции населения из Кавказского региона в Москву и Московскую область). Проблемы туберкулеза и болезни легких. 2006;1:29-35.
13. Андреевская СН, Черноусова ЛН, Смирнова ТГ, Ларионова ЕЕ. Особенность экспрессии генов *icl* и *hspX*, индуцируемых при выживании в организме хозяина, у штаммов *Mycobacterium tuberculosis* кластера W. Проблемы туберкулеза и болезни легких. 2014;92(1):37-41. DOI: 10.21292/2075-1230-2014-0-1-37-42
14. Easterbrook PJ, Gibson A, Murad S, Lamprecht D, Ives N, Ferguson A, et al. High rates of clustering of strains causing tuberculosis in Harare, Zimbabwe: a molecular epidemiological study. J Clin Microbiol. 2004;42(10):4536-44.
15. Chernyayeva E, Dobrynin P, Pestova N, Matveeva N, Zhemkov V, Kozlov A. Molecular genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains spread in different patient groups in St. Petersburg, Russia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012 Aug; 31(8):1753-7. DOI: 10.1007/s10096-011-1497-2
16. Sheen P, Couvin D, Grandjean L, Zimic M, Dominguez M, Luna G, et al. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru and exploration of phylogenetic associations with drug resistance. PLoS One. 2013 Jun 24;8(6):e65873. DOI: 10.1371/journal.pone.0065873
17. Demay C, Liens B, Burguière T, Hill V, Couvin D, Millet J, et al. SITVITWEB – A publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. Infect Genet Evol. 2012 Jun;12(4):755-66. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.02.004
18. Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen D. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. Nucleic Acids Res. 2010 Jul;38(Web Server issue):W326-31. DOI: 10.1093/nar/gkq351
19. Reynaud Y, Zheng C, Wu G, Sun Q, Rastogi N. Bayesian population structure analysis reveals presence of phylogeographically specific sublineages within previously ill-defined T group of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One. 2017 Feb 6;12(2):e0171584. DOI: 10.1371/journal.pone.0171584

References

1. World Health Organization: Global tuberculosis report 2015. WHO/HTM/TB/2015.22. Geneva, 2015, 204 p.
2. Nechaeva OB. The tuberculosis situation in Russia in 2015. Federal monitoring Center of counteraction to TB. Available at: <http://mednet.ru/ru/czentr-monitoringa-tuberkuleza/o-czentre.html> (In Russian).

3. Babaeva IYu, Demikhova OV, Kravchenko AV. Disseminirovannyi tuberkulez legkikh u bol'nykh VICH-infektsiei [Disseminated pulmonary tuberculosis in patients with HIV infection]. Ed by V.V.Erokhin. Moscow: "N'Yu TERRA" Publ., 2010, 164 p. (In Russian).
4. Pokrovskii VV. Pochemu VICH/SPID v Rossii vnov' na pod'eme? Shagi professional. 2007;3:29-32. (In Russian).
5. Page KR, Chaisson R, Godfrey-Faussett P. Tuberculosis-HIV coinfection: epidemiology, clinical aspects, and interventions. In: M.Raviglione (Ed), Reichman and Hershfield's Tuberculosis. New York: Informa healthcare, 2006, pp. 371-416.
6. Scholten JN, Driver CR, Munsiff SS. Effectiveness of isoniazid treatment for latent tuberculosis infection among human immunodeficiency virus (HIV)-infected and HIV-negative injection drug users in methadone programs. Clin Infect Dis. 2003;37:1686-92.
7. Blum BR. Tuberkulez. Patogenez, zashchita, kontrol' [TB. Pathogenesis, protection, control]. Moscow: "Meditsina" Publ., 2002, 678 p. (In Russian).
8. Daley CL, Small PM, Schechter GF, Schoolnik GK, McAdam RA, Jacobs WR Jr, Hopewell PC. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. N Engl J Med. 1992;326:231-5.
9. Zagdyn ZM, Kovelonen AYu, Shabalin VN, Heimer R. Untimely found TB cases and causes of death among patients infected with HIV/TB and with TB alone in the Leningrad region. HIV Infection and Immunosuppressive Disorders. 2010;2(1): 70-7. (In Russian).
10. Zimina VN, Kravchenko AV, Viktorova IB. Epidemiology, clinical course and treatment features of tuberculosis in HIV-positive patients. Medicine in Kuzbass. 2011;10(3):6-13. (In Russian).
11. Andreevskaya SN, Chernousova LN, Zemskova ZS, Larionova EE, Smirnova TG. Biologicheskie svoystva shtammov *M. tuberculosis* klastera W. Tuberculosis and Lung Diseases. 2008;85(10):45-50. (In Russian).
12. Andreevskaya SN, Chernousova LN, Smirnova TG, Larionova EE, Kuz'min AV. Transmissiya shtammov mikobakterii tuberkuleza, obuslovlennaya migratsionnymi protsessami v Rossiiskoi Federatsii (na primere migratsii naseleniya iz Kavkazskogo regiona v Moskvu i Moskovskuyu oblast'). Tuberculosis and Lung Diseases. 2006;1:29-35. (In Russian).
13. Andreevskaya S.N., Chernousova L.N., Smirnova T.G., Larionova E.E. Expression of the *ICL* and *HSPX* genes induced during survival in the host in *Mycobacterium tuberculosis* w cluster strains. Tuberculosis and Lung Diseases. 2014;(1):37-42. DOI: 10.21292/2075-1230-2014-0-1-37-42 (In Russian).
14. Easterbrook PJ, Gibson A, Murad S, Lamprecht D, Ives N, Ferguson A, et al. High rates of clustering of strains causing tuberculosis in Harare, Zimbabwe: a molecular epidemiological study. J Clin Microbiol. 2004;42(10):4536-44.
15. Chernyaeva E, Dobrynin P, Pestova N, Matveeva N, Zhemkov V, Kozlov A. Molecular genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains spread in different patient groups in St. Petersburg, Russia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012 Aug; 31(8):1753-7. DOI: 10.1007/s10096-011-1497-2
16. Sheen P, Couvin D, Grandjean L, Zimic M, Dominguez M, Luna G, et al. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru and exploration of phylogenetic associations with drug resistance. PLoS One. 2013 Jun 24;8(6):e65873. DOI: 10.1371/journal.pone.0065873
17. Demay C, Liens B, Burguière T, Hill V, Couvin D, Millet J, et al. SITVITWEB – A publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. Infect Genet Evol. 2012 Jun;12(4):755-66. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.02.004
18. Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen D. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. Nucleic Acids Res. 2010 Jul;38(Web Server issue):W326-31. DOI: 10.1093/nar/gkq351
19. Reynaud Y, Zheng C, Wu G, Sun Q, Rastogi N. Bayesian population structure analysis reveals presence of phylogeographically specific sublineages within previously ill-defined T group of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One. 2017 Feb 6;12(2):e0171584. DOI: 10.1371/journal.pone.0171584

Информация об авторах:

Андреевская Софья Николаевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза»
 Адрес: 107564, Москва, Яузская аллея, 2
 Телефон: (499) 785-9091
 E-mail: andsofia@mail.ru

Ларионова Елена Евгеньевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза»
 Адрес: 107564, Москва, Яузская аллея, 2
 Телефон: (499) 785-9091
 E-mail: larionova_lena@mail.ru

Смирнова Татьяна Геннадьевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза»
 Адрес: 107564, Москва, Яузская аллея, 2
 Телефон: (499) 785-9091
 E-mail: s_tatka@mail.ru

Цветков Андрей Игоревич, кандидат медицинских наук, главный врач ГБУЗ Свердловской области «Противотуберкулезный диспансер»
 Адрес: 620142, Екатеринбург, ул. Чапаева, 9
 Телефон: (343) 257-9504
 E-mail: tsvetkov@ptdso.ru

Эргешов Атаджан Эргешович, доктор медицинских наук, профессор, директор ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза»
 Адрес: 107564, Москва, Яузская аллея, 2
 Телефон: (499) 785-9019
 E-mail: cniit@ctri.ru

Черноусова Лариса Николаевна, доктор биологических наук, профессор, заведующая отделом микробиологии ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза»
 Адрес: 107564, Москва, Яузская аллея, 2
 Телефон: (499) 785-9091
 E-mail: lchernousova@mail.ru

Information about authors:

Sof'ya N. Andreevskaya, PhD, Senior Researcher, Microbiology Department, Central TB Research Institute
 Address: 2, Yauzskaya alley, Moscow, 107564, Russian Federation
 Phone: (499) 785-9091
 E-mail: andsofia@mail.ru

Elena E. Larionova, PhD, Senior Researcher, Microbiology Department, Central TB Research Institute
 Address: 2, Yauzskaya alley, Moscow, 107564, Russian Federation
 Phone: (499) 785-9091
 E-mail: larionova_lena@mail.ru

Tatiana G. Smirnova, PhD, Senior Researcher, Microbiology Department, Central TB Research Institute
 Address: 2, Yauzskaya alley, Moscow, 107564, Russian Federation
 Phone: (499) 785-9091
 E-mail: s_tatka@mail.ru

Andrey I. Tsvetkov, PhD, Chief Medical Officer of the Sverdlovsk region TB dispensary
 Address: 9, Chapayeva Str., Ekaterinburg, 620142, Russian Federation
 Phone: (343) 257-9504
 E-mail: tsvetkov@ptdso.ru

Atadzhan E. Ergeshov, PhD, D Sci, Professor, Director of the Central TB Research Institute
 Address: 2, Yauzskaya alley, Moscow, 107564, Russian Federation
 Phone: (499) 785-9019
 E-mail: cniit@ctri.ru

Larisa N. Chernousova, PhD, D Sci, Professor, Head of the Microbiology department, Central TB Research Institute
 Address: 2, Yauzskaya alley, Moscow, 107564, Russian Federation
 Phone: (499) 785-9091
 E-mail: lchernousova@mail.ru

Разработка компьютерной программы для количественной оценки цифрового изображения бактерий, полученного с помощью трансмиссионного электронного микроскопа

С.О.Навольнев

ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи»
Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Разработана компьютерная программа для анализа цифрового изображения бактерий, полученного с помощью трансмиссионного электронного микроскопа. Метод основан на автоматическом выделении областей с пониженной яркостью с последующим анализом их геометрических и яркостных характеристик. Программа удобна в работе, можно быстро обработать много фотографий. Программу можно использовать на обычном персональном компьютере для количественного изучения влияния различных факторов на морфологию бактериальной клетки.

Ключевые слова: компьютерное зрение, морфология бактерий, ультраструктура бактерий

Для цитирования: Навольнев С.О. Разработка компьютерной программы для количественной оценки цифрового изображения бактерий, полученного с помощью трансмиссионного электронного микроскопа. Бактериология. 2017; 2(2): 20–23. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-20-23

The computer program for a quantitative estimation of the digital image of bacteria received by transmission electronic microscope

S.O.Navolnev

N.F.Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

A computer program has been developed for analyzing the digital image of bacteria obtained by means of a transmission electron microscope. The method is based on automatic allocation of areas with reduced brightness with subsequent analysis of their geometric and luminance characteristics. The program is easy to use, you can quickly process a lot of photos. The program can be used on an ordinary personal computer to quantitatively study the influence of various factors on the morphology of the bacterial cell.

Keywords: computer vision, morphology of bacteria, ultrastructure of bacteria

For citation: Navolnev S.O. The computer program for a quantitative estimation of the digital image of bacteria received by transmission electronic microscopes. Bacteriology. 2017; 2(2): 20–23. (In Russian) DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-20-23

В медицинской микробиологии широко используется микроскопический метод исследования, в частности метод трансмиссионной электронной микроскопии. Все еще часто применяется визуальный и поэтому субъективный метод оценивания препарата, который имеет недостатки. Для повышения объективизации информации, получаемой

от изображения, применяют компьютерные программы, построенные с применением ряда правил. Однако изображение бактерий, получаемое с помощью электронного микроскопа, чрезвычайно сложное, поэтому общепринятой схемы анализа не существует. Иногда используются компьютерные программы для анализа изображения микроор-

Для корреспонденции:

Навольнев Сергей Олегович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России

Адрес: 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

Телефон: (495) 757-4964

E-mail: navoln@mail.ru

Статья поступила 24.04.2017 г., принята к печати 30.06.2017 г.

For correspondence:

Sergey O. Navolnev, PhD, Senior Researcher, N.F.Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology

Address: 18 Gamaleya str., Moscow, 123098 Russian Federation

Phone: (495) 757-4964

E-mail: navoln@mail.ru

The article was received 24.04.2017, accepted for publication 30.06.2017

ганизмов, но при этом, как правило, определяют 4–6 параметров (в основном длину, площадь), что крайне недостаточно для такого сложного изображения как клетка [1].

Существует много неспециализированных программ (алгоритмов) для анализа изображения [2, 3], но в этом типе изображений есть свои особенности, которые надо учитывать.

Мы поставили цель – разработать программу, которая давала бы возможность выявлять области пониженной яркости на сложном электронно-микроскопическом цифровом изображении бактериальной клетки и в дальнейшем определять их геометрические и яркостные характеристики. Это даст возможность привести количественную характеристику структур на этом изображении, а также продемонстрировать возможности программы на конкретном материале.

Стандартные приемы первоначального анализа изображения взяты из [2, 3].

Программа написана на Visual Basic 6.0 и может использоваться на IBM-совместимых компьютерах с Windows XP и выше. Время обработки одного изображения размером 500 × 300 пикселей, без визуализации промежуточных результатов, при использовании процессора «Пентиум» несколько секунд, с визуализацией промежуточных результатов – несколько десятков секунд.

Описание программы

В программе используется цветовое пространство «серый» цвет, имеющий 256 значений, формат исследуемых файлов – bmp или jpg.

Как известно, цифровое изображение разбито сеткой, каждый квадрат ее, называемый пикселем, имеет некое значение (в данном случае яркости) и свой номер по горизонтали и вертикали.

Для анализа исходного изображения применяется ряд алгоритмов, в результате работы которых для пикселей исходного изображения получаются некие новые значения [2, 3].

Для контроля над процессами обработки применили метод научной визуализации. Он заключается в следующем: величину новых значений на изображении можно отобразить разными цветами и по некой условной шкале (например, использовать последовательность цветов радуги) количественно выразить некую величину.

Изображение бактерии состоит из областей с различной интенсивностью окраски, разной площади, стоит задача – выделить области с локальной максимальной интенсивностью окраски или минимальной яркостью. Четко выделить эти области трудно, поскольку они часто не лежат отдельно, а соприкасаются друг с другом, и визуально определить

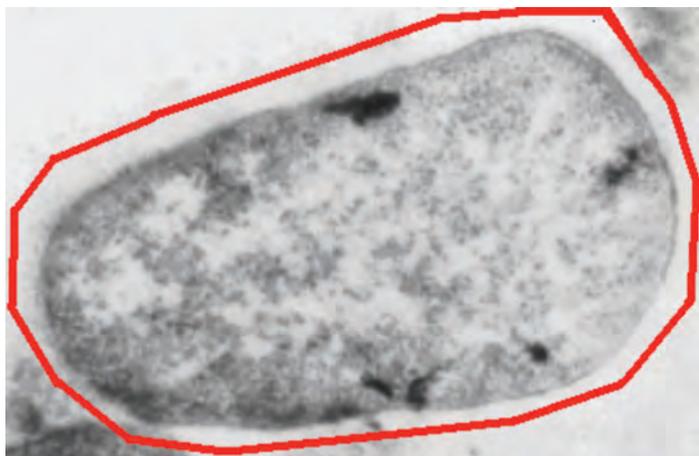


Рис. 1. Исходное фото *E. coli*, исследуемая область обведена красной линией.

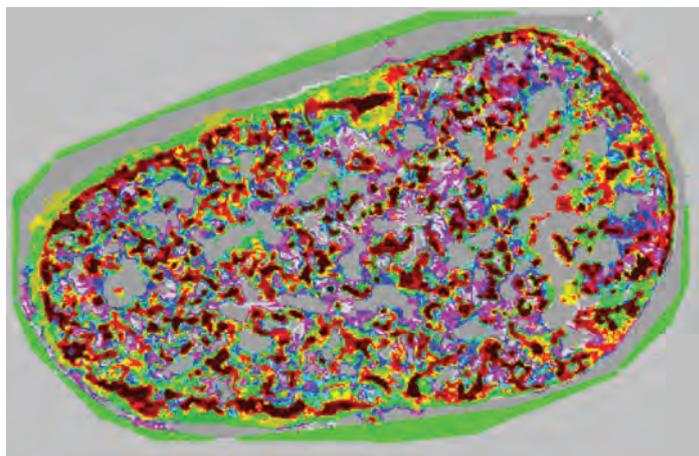


Рис. 2. Фото *E. coli*, визуализация работы алгоритма поиска минимумов яркости.

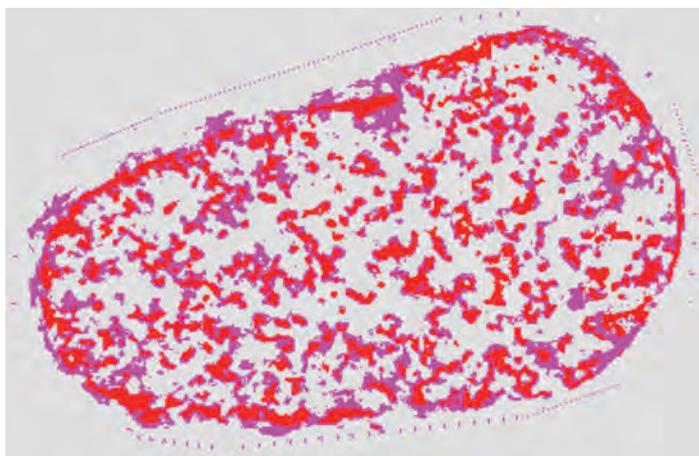


Рис. 3. Фото *E. coli*: выделены 3 области с повышенной интенсивностью окраски (красным), с пониженной интенсивностью окраски (серым) и промежуточные значения (фиолетовым).

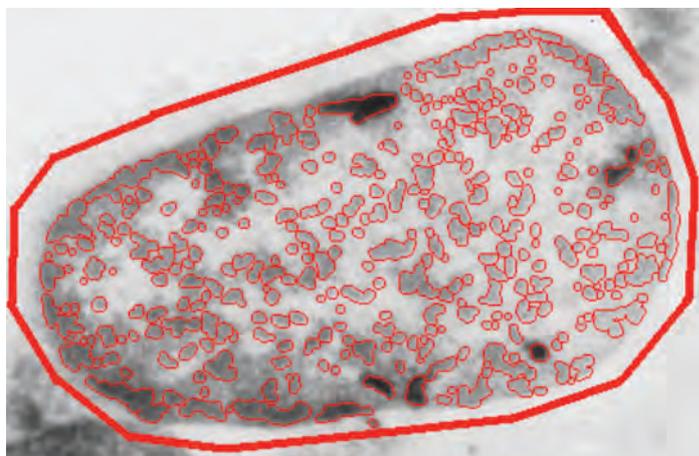


Рис. 4. Исходное фото *E. coli*, области с повышенной интенсивностью окраски обведены тонкой красной линией.

границу сложно. Мы предлагаем следующий алгоритм для выделения мест расположения таких областей.

Сначала надо выбрать (определить) изображение нужной бактерии на исследуемом изображении, чтобы программа знала, какую область анализировать. Для выделения нужную бактерию обводят красной толстой линией, и программа будет анализировать пространство внутри обведенной области (рис. 1).

Программа переводит изображение в двумерный массив:
 $m1(x, y) = I$,
где x, y – координаты пикселей; I – яркость.

Затем для уменьшения шума усредняется изображение и проводится дискретизация яркости в 10 раз:

$$m2(x, y) = m1(x, y)/10.$$

Далее программа ищет минимумы яркости, отражающие количество электронноплотного материала. Для этого из

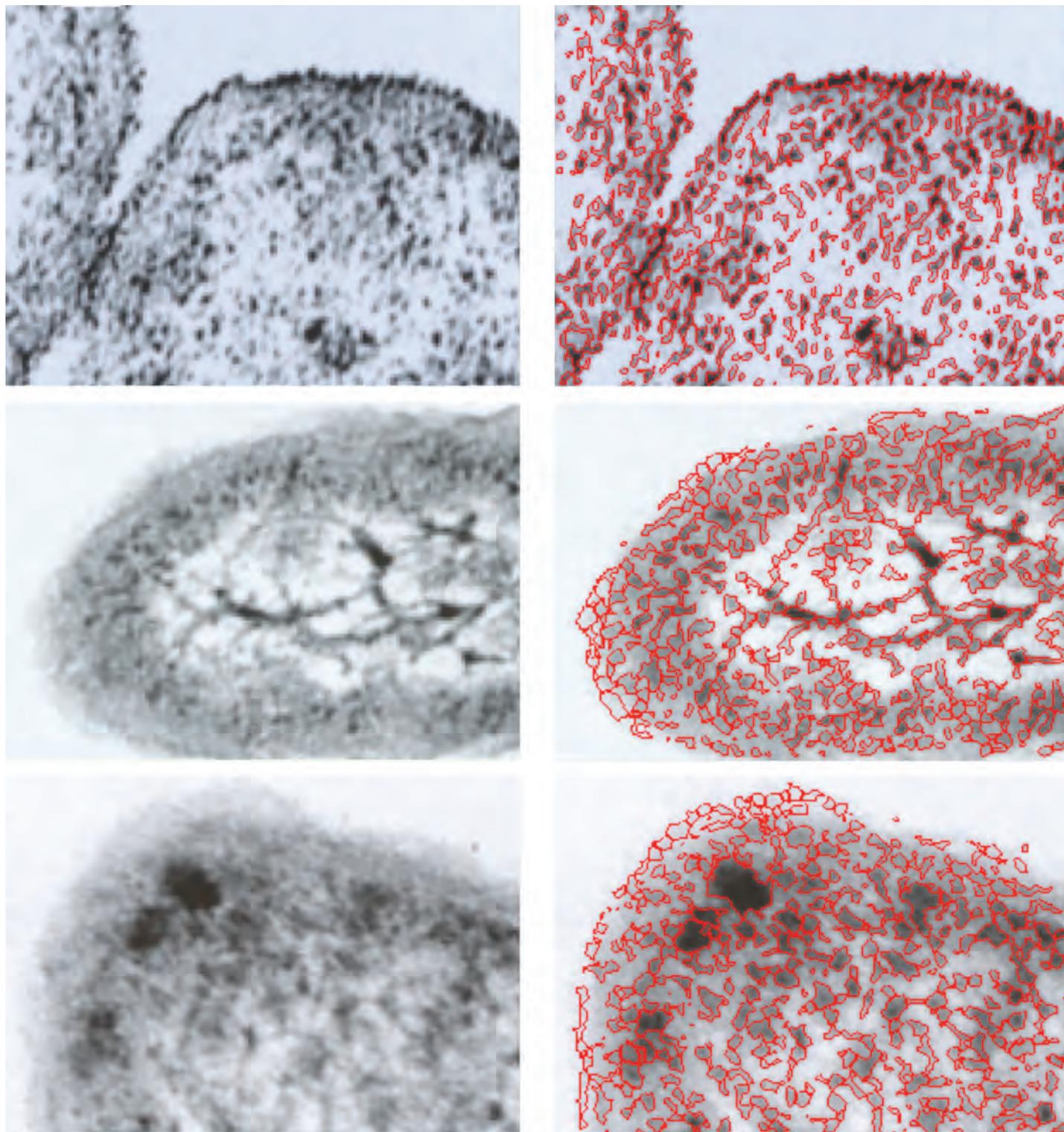


Рис. 5. Фото разных *Iersinia pseudotuberculosis* до (слева) и после выделения окрашенных областей программой (справа – обведено красными линиями).

каждого пикселя изображения испускается виртуальный пучок векторов (16 штук), вектор останавливается, коснувшись более яркого пикселя или достигнув определенного размера. Подсчитывается количество векторов (k_v), направленных в сторону большей яркости, и это количество присваивается аналогично расположенному пикселю нового изображения. На рис. 2 представлен результат работы алгоритма, количество k_v представлено в псевдоцветах:

$$m(x, y) = k_v.$$

Для области с минимумом яркости все вектора будут направлены в сторону большей яркости: $k_v = 16$, для равномерно изменяющихся слоев яркости: $k_v = 9-7$, для однородной яркости: $k_v = 0$.

При анализе изображения некоторые части его обрабатываются тем или иным образом и пикселям присваиваются новые значения. Чтобы контролировать это, в программе применяется прием «научной визуализации», т.е. имеется ряд окошек, в которых появляется сначала исходное изображение, затем обработанное 1-й раз, 2-й раз и т.д. Появляются области на исходном изображении, которые окрашены определенным цветом в зависимости от величины параметра k_v (рис. 2–4).

Условно разделим величину k_v на 3 части и, соответственно, получим 3 типа областей на изображении бактерии, окрасим их соответственно в красный, фиолетовый или серый цвет:

пиксели с $k_v = 16-13$ – назовем областью А – с повышенным содержанием биоматериала, на рис. 3 изображены красным; она отражает не только интенсивность окраски (яркость), но и «качество минимума»;

с $k_v = 0-8$ – назовем областью В – с пониженным содержанием биоматериала, изображены серым;

с $k_v = 9-12$ – назовем областью Б – промежуточных значений, изображены фиолетовым (рис. 3).

В данной работе проанализируем области А. Программа ищет объекты – группы связанных пикселей с $k_v > 12$.

Таким образом, программа определяет общую характеристику изображения: общую площадь областей и количество отдельных областей с повышенным содержанием биоматериала. А также площадь, занимаемую всей бактерией, среднюю яркость, разброс яркости и суммарную яркость (оптический объем).

Для каждой отдельной области определяет:

- площадь;
- координаты центра;
- расстояние от центра до контура бактерии;
- среднюю яркость и среднее квадратичное отклонение;
- суммарную яркость (оптический объем);
- оценивает особенности контура (окружность, вытянутое пятно или сложная форма).

Значения вышеуказанных параметров записываются в Базу данных (сделанную в виде текстового файла) для хранения и последующего использования при сравнении разных изображений бактерий.

Эту программу предполагаем использовать также и для анализа эукариотических клеток.

Проанализировали фотографии *Iersinia pseudotuberculosis*, выращенных в разных условиях, взято из [1] (рис. 5).

Программа выделяет на одном изображении *Iersinia pseudotuberculosis* 300–500 областей, большинство которых приблизительно совпадают с визуальным выделением окрашенных пятен. Если учесть, что для каждой области выделенной программой производится вычисление 7 параметров, то в результате будет несколько тысяч данных.

Таким образом, программа позволяет быстро провести «интегральный» количественный анализ исследуемого изображения, получить для изображения одной бактерии тысячи данных.

Программа относительно проста в применении, работает по принципу: загрузил фотографию, выделил исследуемую область, нажал на кнопку, получил результаты. Достаточно быстро обрабатывает фотографии, можно использовать обычный персональный компьютер.

Программу можно применять для сравнительного количественного изучения влияния различных воздействий (условия среды, температуры, лекарственных веществ и проч.) на морфологию бактериальной клетки [4, 5].

Литература

1. Сомова ЛМ, Бузолева ЛС, Плехова НГ. Ультраструктура патогенных бактерий в разных экологических условиях. Владивосток: Медицина ДВ, 2009, 200 с.
2. Форсайт Д, Понс Ж. Компьютерное зрение. Современный подход. Пер. с англ. Вильямс, 2004, 928 с.
3. Шапиро Л, Стокман Дж. Компьютерное зрение. Пер. с англ. М.: БИНОМ, Лаборатория знаний, 2006, 752 с.
4. Диденко ЛВ, Навольнев СО. Программа для анализа биологических микрообъектов на изображениях полученных от электронного микроскопа. Научная сессия НИЯУ МИФИ-2012, том 1. Инновационные ядерные технологии. Высокие технологии в медицине. М.: НИЯУ МИФИ, 2012, 286 с.
5. Навольнев СО, Диденко ЛВ. Программа для определения морфологических особенностей микрообъектов на изображениях полученных от микроскопа. Медицинский алфавит. 2010;1(2):41-2.

References

1. Somova LM, Buzoleva LS, Plekhova NG. Ul'trastruktura patogennykh bakterii v raznykh ekologicheskikh usloviyakh [Ultrastructure of pathogenic bacteria in different ecological conditions]. Vladivostok: "Meditsina DV" Publ., 2009, 200 p. (In Russian).
2. David A. Forsyth, Jean Ponce. Computer Vision: A Modern Approach, 2004, 928 p. (In Russian).
3. Linda G. Shapiro, George C. Stockman. Computer Vision. Moscow: "BINOM, Laboratoriya znaniy" Publ., 2006, 752 p. (In Russian).
4. Navolnev SO, Didenko LV. Program for the analysis of biological micro-objects in the images obtained from the electron microscope. Scientific session MEPhi-2012, volume 1. Innovative nuclear technology. High technology in medicine. Moscow: National Research Nuclear University MEPhi, 2012, 286 p. (In Russian).
5. Navolnev SO, Didenko LV. The program for definition of morphological features of biological microobjects on the images received from microscope. Meditsinskiy alfavit. 2010;1(2):41-2. (In Russian).

Автоматизированная система оценки пролиферативной активности эукариотических клеток в токсикологических исследованиях *in vitro*

Л.В.Коломбет

ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Серпуховский район, Московская обл., Российская Федерация

В исследовании оценили возможность использования прибора Cell-IQ (Chip-Man Technologies Ltd., Финляндия) в токсикологических исследованиях *in vitro*. Прибор Cell-IQ используется для непрерывного инкубирования и анализа культур клеток животных и человека. Определили точность подсчета клеток с помощью программы Analyser прибора Cell-IQ в сравнении с визуальным методом. Показали, что подсчет клеток на микрофотографиях программой Analyser позволяет определять пролиферативную активность культуры с той же точностью, что и при помощи визуального подсчета клеток. Также сравнили данные о цитотоксичности, полученные с помощью прибора и традиционным методом с использованием красителя нейтрального красного (NRU). Показали, что использование прибора Cell-IQ позволяет получать результаты по цитотоксичности, сопоставимые с методом NRU, при этом дает возможность более детально исследовать ответ клеток на токсическое воздействие.

Ключевые слова: Cell-IQ, цитотоксичность, культура клеток, машинное зрение, токсикология *in vitro*

Для цитирования: Коломбет Л.В. Автоматизированная система оценки пролиферативной активности эукариотических клеток в токсикологических исследованиях *in vitro*. Бактериология. 2017; 2(2): 24–29. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-24-29

An autosystem for measuring proliferative activity of eukaryotic cells in toxicological research *in vitro*

L.V.Kolombet

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

The possibility to use Cell-IQ equipment (Chip-Man Technologies Ltd., Finland) for *in vitro* toxicological research has been evaluated. The Cell-IQ device is a platform for constant incubating and analyzing human and animal cell cultures. The accuracy of counting cells using a Cell-IQ Analyzer software vs a visual procedure was determined. The Analyzer-based counting of cells on micrographs was shown to allow determining culture proliferative activity with the same accuracy as the visual method does. Cytotoxicity results obtained with the device as well as by a conventional NRU procedure were compared. The Cell-IQ device was shown to provide cytotoxicity data comparable with those obtained by the NRU method, making possible studying a cell response to toxic exposure in more detail.

Keywords: Cell-IQ, cytotoxicity, cell culture, machine vision, toxicology *in vitro*

For citation: Kolombet L.V. An autosystem for measuring proliferative activity of eukaryotic cells in toxicological research *in vitro*. Bacteriology. 2017; 2(2): 24–29. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-24-29

Токсикологические исследования *in vitro* в настоящее время становятся все более популярными по ряду этических и экономических причин. Некоторые методы оценки токсичности веществ *in vitro* прошли валидацию в Европе и США в соответствующих регламентирующих организаци-

ях [1]. В условиях постоянного появления новых химических соединений и наноструктурированных веществ и необходимости их токсикологической оценки заслуживает особого внимания оборудование, позволяющее максимально автоматизировать процесс сбора информации о токсичности тех

Для корреспонденции:

Коломбет Любовь Васильевна, доктор биологических наук, заведующая научной частью ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: info@obolensk.org

Статья поступила 10.05.2017 г., принята к печати 30.06.2017 г.

For correspondence:

Liubov V. Kolombet, Sc.D. (Bio.), scientific secretary, head of science department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: info@obolensk.org

The article was received 10.05.2017, accepted for publication 30.06.2017

или иных веществ с использованием культур клеток млекопитающих. Таким оборудованием являются инвертированные микроскопы ведущих мировых производителей, оснащенные климатической камерой, моторизованным предметным столиком и компьютерным обеспечением для наблюдения за поведением клеток в режиме реального времени. Кроме того, появились специализированные приборы, такие как, например, выпускает фирма BD Biosciences (www.bdbiosciences.com), или прибор Cell-IQ (Chip-Man Technologies, Tampere, Finland, www.chipmantech.com). Эти приборы специально предназначены для культивирования и анализа клеточной популяции в динамике [2–4].

В настоящей работе оценили точность распознавания клеток на микрофотографиях с помощью программы Cell-IQ Analyser в сравнении с визуальным подсчетом. Также провели сравнение данных о цитотоксичности, полученных двумя методами: по включению красителя нейтрального красного (NRU) и с использованием прибора Cell-IQ.

Материалы и методы

Модельные токсиканты. Базовую суспензию одностенных углеродных нанотрубок (ОУНТ) (12 000 мкг/мл) («Карбонлайт», Россия) готовили в 4% водном растворе проксанола-268 (синтетическое неионогенное ПАВ). Из базовой суспензии делали ряд последовательных разведений, также в 4% водном растворе проксанола-268. После обработки на ультразвуковом дезинтеграторе Ultrasonic Processor (Cole Parmer, США) в течение 10 мин при выходной мощности 300 Вт суспензию вносили в культуральную среду. Конечная концентрация проксанола-268 в культуральной среде не превышала 1%.

Базовый раствор Т-2 токсина (Biorige, Австрия) готовили в диметилсульфоксиде (ДМСО) в концентрации 10 мг/мл. Для тестирования цитотоксичности делали ряд последовательных разведений Т-2 токсина.

Клеточные культуры. Первичную культуру крысиных эмбриональных фибробластов выделяли по описанной методике [5]. Культуру карциномы легкого человека A549 получили из Российской коллекции клеточных культур позвоночных, г. С.-Петербург. Культуры клеток культивировали в среде DMEM (Gibco, США), содержащей 20 мМ бикарбоната натрия и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), в атмосфере газовой смеси воздух/CO₂ 5% при 37°C.

Оборудование. Прибор Cell-IQ (Chip-Man Technologies Ltd, Финляндия) состоит из камеры для культивирования клеток, системы микроскопического видеонаблюдения и программного обеспечения Analyser для анализа изображений. Во время инкубирования выбранная оператором область в каждой лунке фотографируется в автоматическом режиме с заданной периодичностью (зависит от задачи; в данном исследовании – 1 ч), после чего изображения анализируются с помощью программы Analyser. Более подробная информация о приборе размещена на сайте производителя, а также дана в публикациях о возможностях Cell-IQ [6–8].

Оценка цитотоксичности. Для проведения экспериментов клетки рассеивали в 24- и 48-луночные планшеты (Greiner, Германия) в концентрации $3,75 \times 10^4$ клеток/мл и культивировали в течение 24 ч. Затем к клеткам добавляли возрастающие концентрации модельных токсикантов. ОУНТ – в кон-

центрациях 10, 100, 1000, 2000 и 3000 мкг/мл, в качестве контролей использовали воду, 1% проксанол-268 и 0,1 М NaCl. Т-2 токсин – в концентрациях 1, 5, 10, 15, 20 и 40 нг/мл, в качестве контроля использовали ДМСО в конечной концентрации 0,5%. Клетки культивировали в течение 24 ч в приборе Cell-IQ, после чего планшет использовали для постановки теста NRU. Тест проводили по описанной методике [9–11]. Цитотоксичность выражали в процентах измеряемого параметра относительно контроля, принимаемого за 100%.

Статистическая обработка данных. Модельные токсиканты исследовали в 2–3 независимых экспериментах, по 5–6 повторов на каждый вариант концентрации токсиканта. На диаграммах указывали доверительный интервал при 95% уровне значимости. Цитотоксическую дозу, вызывающую снижение исследуемого показателя на 50% от контроля (ЦТД50), оценивали на основе нелинейной логистической модели, содержащей четыре параметра, с помощью программы SigmaPlot v. 9.01 (Systat Software Inc.).

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ результатов визуального и автоматизированного подсчета клеток. В основу программы Cell-IQ Analyser заложен один из элементов искусственного интеллекта – принцип машинного зрения. Он давно применяется в различных промышленных технологиях [11], но в биологии использование этого принципа пока не нашло широкого применения [1, 7, 12, 13]. Поэтому целью данного эксперимента был анализ точности распознавания клеток программой Analyser на микрофотографиях в сравнении с визуальным подсчетом клеток на тех же микрофотографиях.

Анализ провели в экспериментах по оценке воздействия ОУНТ на культуру карциномы легкого человека A549. В настоящее время активно изучаются вопросы, связанные с возможной токсичностью углеродсодержащих наноматериалов, в том числе с механизмами их действия на клеточном уровне [14]. Это обусловлено перспективами их применения в технике и медицине [15]. Кроме того, эти вещества обладают ограниченной растворимостью и тенденцией к агрегации, что вызывает получение противоречивых результатов при их исследовании. В связи с этим представляет определенный интерес оценка возможности использования системы Cell-IQ для исследования потенциальной цитотоксичности ОУНТ.

Перед проведением анализа создали библиотеку изображений клеток в различных морфо-физиологических состояниях (морфотипов), распределяя их по категориям: стабильные, делящиеся, аномальные и мертвые (рис. 1, а). Эту информацию встраивали в алгоритм программы, что позволяло ей идентифицировать и подсчитывать клетки различных категорий (рис. 1, б, в, г).

В ходе эксперимента проанализировали микрофотографии клеток в количестве 71:37 в начале эксперимента (0 ч) и 34 – в конце (через 24 ч). Ошибку при подсчете клеток программой Analyser относительно визуального подсчета на одном и том же изображении оценивали по формуле:

$$\Delta\% = \frac{|N_B - N_A|}{N_B} \times 100,$$

где N_B – количество клеток, подсчитанное визуально; N_A – количество клеток, подсчитанное программой Analyser.

Все поля зрения после подсчета ошибки распределили по категориям согласно уровню ошибки: 0–5%, 5–10%, 10–15%, 15–20% и >20%. Результаты приведены на рис. 2, а. Оказалось, что в 93% случаев ошибка не превышала 15%, т.е. при истинном количестве клеток на микрофотографии, равном 100, результат подсчета с помощью программы составлял 85–115 клеток. Таким образом, программа Analyser может быть использована для подсчета клеток с указанной точностью.

Далее оценили применимость автоматического подсчета для определения уровня пролиферации культуры A549 при воздействии различных концентраций ОУНТ. Коэффициент пролиферации рассчитывали путем деления количества клеток в конце эксперимента (24 ч) на количество клеток в начале (0 ч). Значения коэффициента получали с использованием автоматического и визуального подсчетов, результаты сравнительного анализа приведены на рис. 2, б.

Значения коэффициентов пролиферации, определенные с помощью программы Analyser и полученные визуальным методом, достоверно не различаются ($p < 0,05$) (точки 1, 2, 3, 4, 5 и 8). Исключение составляют значения для двух вариантов опыта (точки 6 и 7), полученных при обработке клеток высокими концентрациями суспензий нанотрубок (2000–3000 мкг/мл). В этом случае высокая концентрация токсиканта приводила к увеличенной сорбции его на поверхности клеток и культурального пластика. В результате получали фотографии, трудно распознаваемые программой. Это приводило к существенной ошибке при автоматизированном подсчете клеток и к значительным различиям в оценках коэффициента пролиферации между двумя методами подсчета клеток.

Таким образом, автоматический метод подсчета клеток с помощью программы Cell-IQ Analyser позволяет в ряде случаев заменить трудоемкий и длительный метод визуаль-

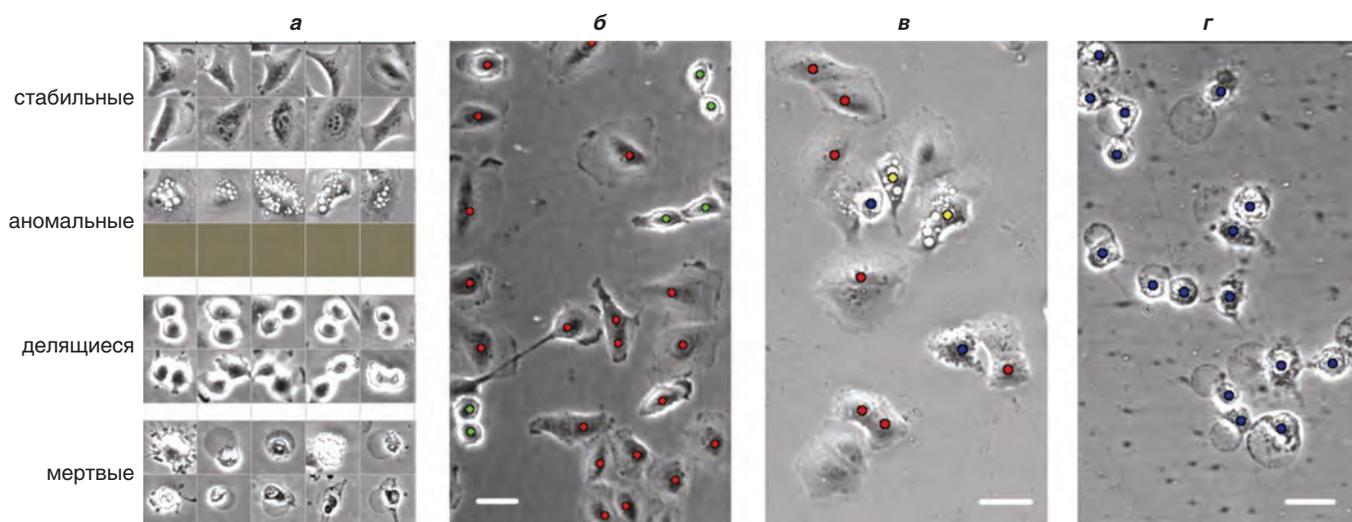


Рис. 1. Библиотека морфотипов клеток A549 и пример анализа микрофотографий с помощью программы Cell-IQ Analyser. Фазовый контраст: а – библиотека морфотипов клеток; б, в и г – примеры распознавания клеток A549 программой Analyser. Отмечены цветом: красным и зеленым – стабильные и делящиеся клетки соответственно (б); желтым – морфологически аномальные клетки (в); синим – мертвые клетки (г). Длина линейки – 30 мкм.

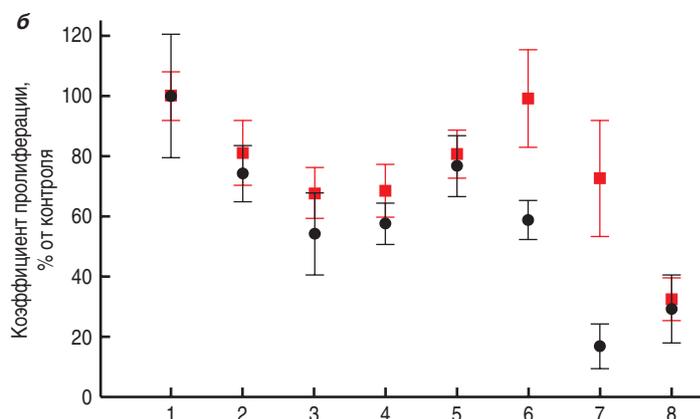
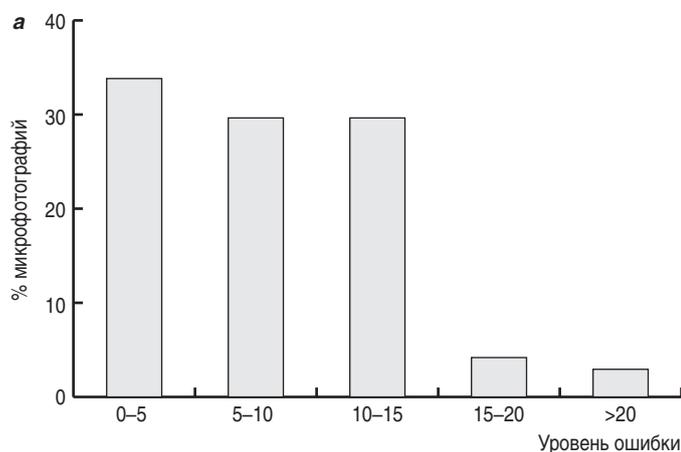


Рис. 2. Сравнительный анализ визуального и автоматического подсчета клеток: а – точность подсчета клеток на микрофотографиях; б – значения коэффициентов пролиферации культуры A549 под воздействием модельных токсикантов, определенные двумя методами подсчета (■ – Analyser, ● – визуальный подсчет): 1 – контроль 1 (вода); 2 – контроль 2 (1% проксанол-268); 3 – ОУНТ (10 мкг/мл); 4 – ОУНТ (100 мкг/мл); 5 – ОУНТ (1000 мкг/мл); 6 – ОУНТ (2000 мкг/мл); 7 – ОУНТ (3000 мкг/мл); 8 – контроль 3 (0,1 М NaCl, воспроизводимость тест-системы).

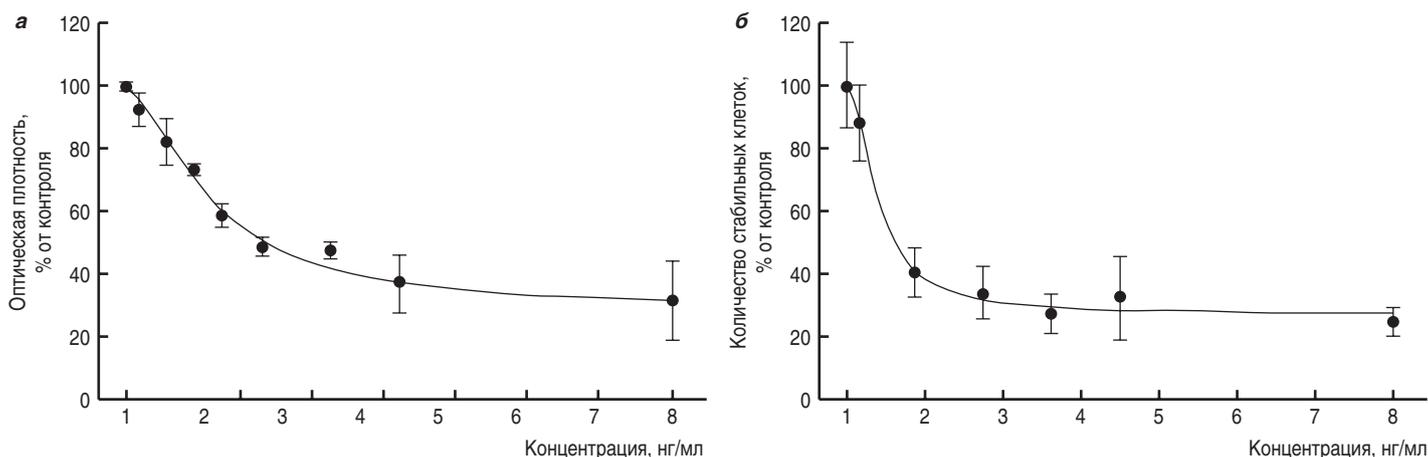


Рис. 3. Цитотоксическое действие Т-2-токсина на культуру крысиных эмбриональных фибробластов: а – метод NRU. Коэффициент корреляции $R^2 = 0,94$; б – метод Cell-IQ. Коэффициент корреляции $R^2 = 0,97$.

ного подсчета, однако требует высокого качества получаемых изображений клеток. В отдельных случаях (например, низкое качество микрофотографий вследствие особенностей токсиканта, см. выше) можно комбинировать оба метода для получения достоверных результатов исследования.

Сравнительный анализ оценки цитотоксичности токсиканта с использованием метода NRU и прибора Cell-IQ. Одним из классических методов оценки цитотоксичности является метод NRU. Целью данного раздела работы было сравнение результатов определения цитотоксичности, полученных с помощью прибора Cell-IQ и метода NRU. Для данного исследования выбрали один из микотоксинов трихотеценового ряда – Т-2-токсин. Этот токсин хорошо изучен, имеется достаточно публикаций по определению его цитотоксичности на различных культурах клеток [16].

Цитотоксичность Т-2-токсина оценивали на культуре крысиных эмбриональных фибробластов. Цитотоксическое действие Т-2-токсина, определенное методом NRU, иллюстрирует рис. 3, а. Показали дозозависимое действие Т-2-токсина на культуру фибробластов. Цитотоксическая доза (ЦТД50) составила $6,36 \pm 0,53$ нг/мл.

Далее оценили цитотоксическое действие Т-2-токсина с помощью прибора Cell-IQ. Как и для культуры A549, для крысиных эмбриональных фибробластов создали библиотеку морфотипов, с помощью которой программу «обучили» распознавать данную культуру. Результаты представлены на рис. 4.

Программа Analyser позволяет представить графически динамику состояния культуры в ходе эксперимента. Графики демонстрируют изменение во времени как общего количества клеток (см. рис. 4, а), так и процентное содержание разных морфотипов клетки (рис. 4, б). Так, на графиках видно, что в контроле и при концентрации Т-2-токсина 1 нг/мл происходит размножение клеток, и количество стабильных клеток в процентном отношении остается постоянным. В то же время при более высокой концентрации микотоксина (10 нг/мл) прекращается пролиферация культуры, а также происходит снижение количества стабильных клеток. Таким образом, ответ клеток на воздействие токсина складывается из процессов уменьшения пролиферации (в большей степени) и изменения/гибели (в меньшей степени).

Однако формат получаемых результатов отличается от формата NRU-метода, поэтому для облегчения сравнения двух методов данные Cell-IQ изобразили в сходных координатах, т.е. использовали только одну временную точку (24 ч) и получили зависимость относительного количества клеток от концентрации микотоксина (см. рис. 3, б). Цитотоксическая доза составила $2,31 \pm 0,33$ нг/мл. Представление данных в единой системе координат позволило выявить сходство зависимости показателя цитотоксичности от концентрации токсиканта при использовании двух методов оценки. Рассчитанные значения ЦТД50 можно также считать близкими ($2,31 \pm 0,33$ и $6,36 \pm 0,53$ нг/мл), поскольку диапазон этого показателя достаточно широк и ЦТД50, полученные различными исследователями, колеблются от 0,5 до 26 нг/мл [17].

Таким образом, результаты оценки цитотоксичности с использованием прибора Cell-IQ соответствуют таковым, полученным классическим методом NRU, однако дают более детальное представление об ответе клеток на токсическое воздействие.

Полученные данные согласуются с результатами исследования, выполненного Toimela с соавт. на культурах клеток почки человека HK-2 и рака груди MCF-7 [7]. Авторы показали, что результаты определения цитотоксичности, полученные с помощью прибора Cell-IQ, сравнимы с данными по цитотоксичности, полученными с использованием классических методов (NRU, окрашивание кристалл-виолетом и Хёхст 33258).

Метод NRU и другие, основанные на подобном подходе (МТТ), не позволяют использовать клетки для дальнейшего анализа, поскольку во время выполнения методики клетки погибают. Преимуществом использования прибора Cell-IQ является возможность продолжения эксперимента после получения данных о цитотоксичности с целью, например, изучения способности культуры восстанавливаться после токсического воздействия (так называемый «recovery test»). Кроме того, прибор позволяет наблюдать за ответом клеток на токсическое воздействие в любой момент в ходе эксперимента, а не только по его окончании. Следует отметить и другие недостатки метода NRU. Этот метод окраски клеток основан на определении оптической плотности (OD) краси-

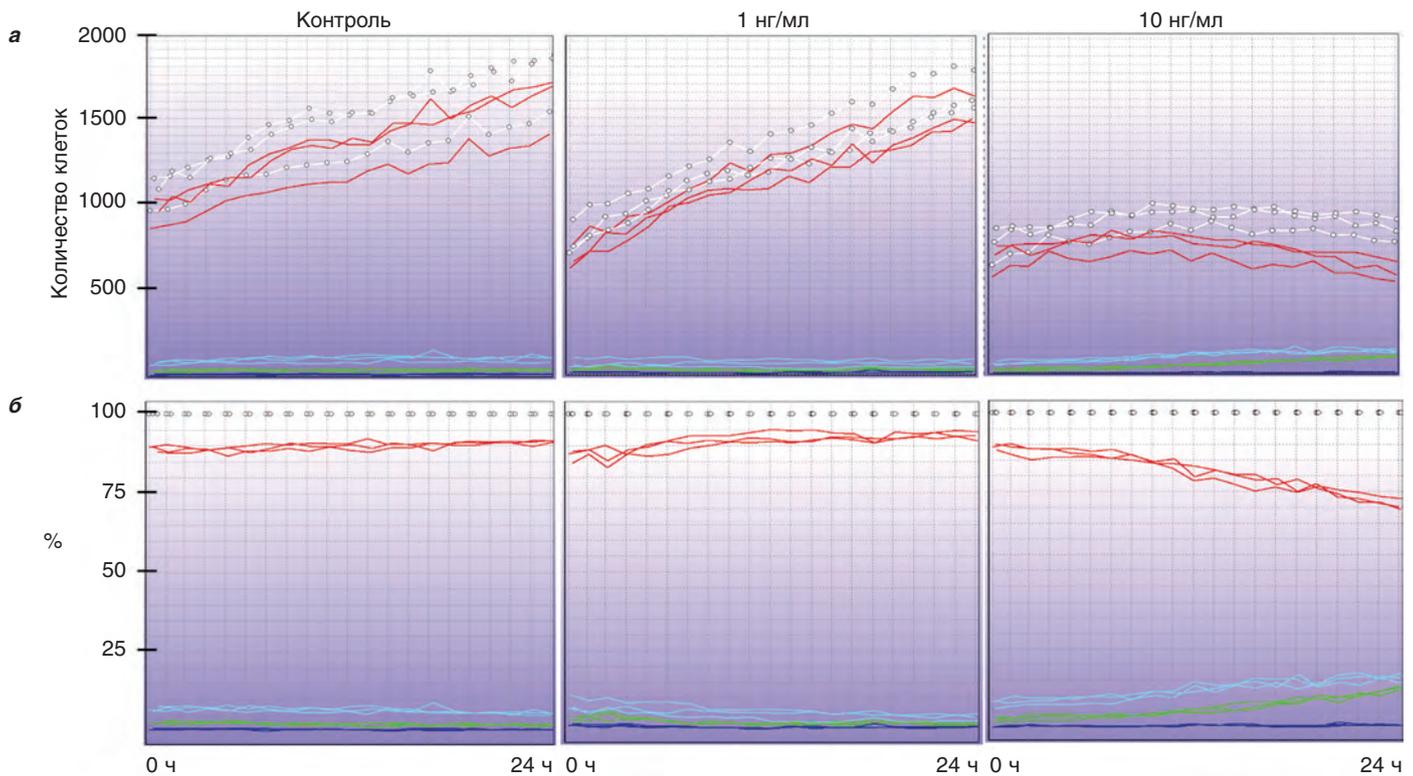


Рис. 4. Изображения динамики роста культуры эмбриональных фибробластов крысы в течение 24 ч при воздействии Т-2-токсина, полученные с помощью программы Cell-IQ Analyser: а – динамика изменения абсолютных значений количества клеток при воздействии указанных концентраций токсина; б – динамика изменения количества клеток в разном физиологическом состоянии относительно общего количества клеток, принятого за 100%. Обозначения: точки, соединенные светлой линией, – общее количество клеток, красная линия – стабильные клетки, голубая линия – клетки, имеющие морфологические отклонения от нормы, синяя линия – делящиеся клетки, зеленая линия – мертвые клетки.

теля, поглощенного живыми клетками. Показана линейная зависимость между OD красителя и количеством живых клеток [9, 10]. На основании вышеуказанной зависимости снижение показателя OD свидетельствует об увеличении цитотоксичности. Однако не всегда изменение OD красителя после воздействия отражает снижение жизнеспособности (гибель) клеток. Это может быть результатом снижения пролиферативной активности культуры (цитостатический эффект) либо изменения проницаемости мембраны для красителя. Так, в предыдущих исследованиях при изучении цитотоксичности проксанола-268 методом NRU мы наблюдали стимуляцию пролиферативной активности крысиных эмбриональных фибробластов в 1,5 раза. Использование прибора Cell-IQ показало, что пролиферации культуры не происходит. Наблюдаемый эффект, вероятно, может быть связан с увеличением проницаемости мембраны и изменением транспорта красителя в клетку. Влияние исследуемого вещества на результат оценки цитотоксичности наблюдали и другие авторы при изучении действия нанотрубок на клетки методом МТТ [14, 15].

Достоинства прибора Cell-IQ очевидны, однако имеются некоторые ограничения в его применении. Так, его нельзя использовать для суспензионных культур клеток. Морфологические особенности некоторых монослойных культур (например, плотное расположение клеток такой культуры как НерG2) приводят к тому, что программа не может распознавать отдельные клетки. Однако данную проблему можно решать с помощью флуоресцентной техники (напри-

мер, окрашивая ядра клеток), что позволяет осуществлять наличие в приборе флуоресцентного модуля.

Таким образом, выполненное исследование показало, что данные, полученные с помощью прибора Cell-IQ и программы Analyser, сопоставимы с методом визуального подсчета клеток. Программа с достаточно высокой точностью распознает клетки, что позволяет использовать прибор для оценки цитотоксичности различных токсикантов и более подробного изучения производимых ими эффектов. Также следует подчеркнуть, что выводы о сопоставимости сравниваемых методов сделаны с использованием двух разных модельных систем (первичные крысиные фибробласты и постоянная раковая линия человека, два не схожих с химической точки зрения соединения – микотоксин Т-2 и углеродные нанотрубки). Это подтверждает возможность универсального применения прибора и прилагаемого программного обеспечения в исследовании цитотоксичности веществ различной химической природы. В настоящее время Cell-IQ используется в исследованиях по онкологии [18–21]. Результаты выполненного исследования свидетельствуют о том, что прибор Cell-IQ и программное обеспечение Analyser могут с успехом применяться в токсикологии *in vitro*.

Автор статьи выражает признательность коллегам из ФГБУН Научно-исследовательский центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства, принявшим плодотворное участие в выполнении и обсуждении результатов данной работы.

Литература/References

1. Liebsch M, Grune B, Seiler A, Butzke D, Oelgeschläger M, Pirow R, Luch A. Alternatives to animal testing: current status and future perspectives. Arch Toxicol. 2011;85:841-858. DOI: 10.1007/s00204-011-0718-x.
2. Min Z, Wang L, Jin J, Wang X, Zhu B, Chen H, Cheng Y. Pyrroloquinoline quinone induces cancer cell apoptosis via mitochondrial-dependent pathway and down-regulating cellular Bcl-2 protein expression. J Cancer. 2014 Jul 29;5(7):609-24. DOI: 10.7150/jca.9002
3. Narkilahti S, Rajala K, Pihlajamäki H, Suuronen R, Hovatta O, Skottman H. Monitoring and analysis of dynamic growth of human embryonic stem cells: comparison of automated instrumentation and conventional culturing methods. Biomedical engineering online. 2007;6(1):11.
4. Wang L, Zhang V, Jin M, Bai C, Wang X. Potential mechanism of interleukin-8 production from lung cancer cells: An involvement of EGF-EGFR-PI3K-Akt-Erk pathway. J Cell Physiol. 2012 Jan;227(1):35-43. DOI: 10.1002/jcp.22722
5. Todaro GJ, Green H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. The Journal of cell biology. 1963;17(2):299-313.
6. Huttunen TT, Sundberg M, Pihlajamäki H, Suuronen R, Skottman H, Äänismaa R, Narkilahti S. An automated continuous monitoring system: a useful tool for monitoring neuronal differentiation of human embryonic stem cells. Stem Cell Studies. 2011;1(1):10.
7. Toimela T, Tahti H, Ylikomi T. Comparison of an automated pattern analysis machine vision time-lapse system with traditional endpoint measurements in the analysis of cell growth and cytotoxicity. Altern Lab Anim. 2008 Jul;36(3): 313-25.
8. Zheng Y, Chen X, Qian M, Zhang M, Zhang D, Bai C, Wang X. Human lung telocytes could promote the proliferation and angiogenesis of human pulmonary microvascular endothelial cells in vitro. Mol Cell Ther. 2014 Feb 1;2:3. DOI: 10.1186/2052-8426-2-3
9. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicol Lett. 1985 Feb-Mar;24(2-3):119-24.
10. Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays—the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. Toxicology in vitro. 1988; 2(1):1-6.
11. Snyder WE, Qi H. Machine vision. Cambridge University Press. 2010.
12. Bahnson A, Athanassiou C, Koebler D, Qian L, Shun T, Shields D, et al. Automated measurement of cell motility and proliferation. BMC Cell Biology. 2005;6(1):19. DOI: 10.1186/1471-2121-6-19
13. Wei N, Flaschel E, Friehs K, Nattkemper TW. A machine vision system for automated non-invasive assessment of cell viability via dark field microscopy, wavelet feature selection and classification. BMC Bioinformatics. 2008 Oct 21; 9:449. DOI: 10.1186/1471-2105-9-449
14. Meindl C, Absenger M, Roblegg E, Fröhlich E. Suitability of cell-based label-free detection for cytotoxicity screening of carbon nanotubes. Biomed Res Int. 2013; 2013:564804. DOI: 10.1155/2013/564804
15. Shvedova AA, Kagan VE. The role of nanotoxicology in realizing the 'helping without harm' paradigm of nanomedicine: lessons from studies of pulmonary effects of single-walled carbon nanotubes. J Intern Med. 2010 Jan;267(1):106-18. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2009.02188.x
16. Gutleb AC, Morrison E, Murk AJ. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by Fusarium strains: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2002;11(3):309-20.
17. Wörle-Knirsch JM, Pulskamp K, Krug HF. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. Nano letters. 2006;6(6):1261-8. DOI: 10.1021/nl060177c
18. Shi L, Wang L, Wang B, Cretoiu SM, Wang Q, Wang X, Chen C. Regulatory mechanisms of betacellulin in CXCL8 production from lung cancer cells. J Transl Med. 2014 Mar 16;12:70. DOI: 10.1186/1479-5876-12-70
19. Zhu K, Pan Q, Jia LQ, Dai Z, Ke AW, Zeng HY, et al. MiR-302c inhibits tumor growth of hepatocellular carcinoma by suppressing the endothelial-mesenchymal transition of endothelial cells. Sci Rep. 2014 Jul 16;4:5524. DOI: 10.1038/srep05524
20. Walter MN, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WE. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. Exp Cell Res. 2010 Apr 15;316(7):1271-81. DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.02.026
21. Luo Z, Yu G, Lee HW, Li L, Wang L, Yang D, et al. The Nedd8-activating enzyme inhibitor MLN4924 induces autophagy and apoptosis to suppress liver cancer cell growth. Cancer Res. 2012 Jul 1;72(13):3360-71. DOI: 10.1158/0008-5472.CCR-12-0388

Ученые следят за секретной внутренней жизнью бактерий

На протяжении многих лет ученые считали, что бактерии не имеют внутренних структур и в основном являются «мешками ферментов». Группа исследователей описали богатую коллекцию таинственных структур и отделений внутри бактерий. Никто не знает функции этих конструкций, но они, по-видимому, важны для бактерий, раз они тратят столько энергии на их создание.

Другая группа ученых представляет первый «атомный взгляд» на полный бактериальный микрокомпаратмент. Эти образования представляют собой белковые оболочки, которые используют бактерии для сохранения определенных химических реакций отдельно от остальной части клетки. Знание того, как собирается микрокомпаратмент, может иметь важные применения в биотехнологии и медицине. Многие исследователи работают над созданием микрокомпаратментов для производства лекарств, промышленных химикатов или биотоплива.

Исследователи, возглавляемые структурным биологом Шерил Керфельд, использовали комбинацию рентгеновской кристаллографии и криоэлектронной микроскопии для изучения микрокомплексов из бактерии *Haliangium ochraceum* и ответа на эти вопросы.

Scientists spy on the secret inner life of bacteria. Science News [Electronic resource].
URL: <https://www.sciencenews.org/article/scientists-spy-secret-inner-life-bacteria?mode=topic&context=93&tgf=nr>
(accessed: 07.07.2017).

Сравнительное секвенирование транскриптомов культур *Yersinia pestis subsp. microti* *bv. ulegeica*, отличающихся по вирулентности для морских свинок

В.И.Соломенцев, Л.А.Кадникова, А.А.Кисличкина, Н.В.Майская,
Т.И.Комбарова, М.Е.Платонов, А.Г.Богун, А.П.Анисимов

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

Возбудитель чумы – грамтрицательная бактерия вида *Yersinia pestis* – включает два подвида: основной, *pestis* – один из наиболее опасных бактериальных патогенов, унесший сотни миллионов человеческих жизней, и неосновной, *microti* – причину крайне редких подобных чуме эндемичных заболеваний, не передающихся от человека человеку. Штаммы этой группы, условно патогенные для людей, как правило, авирулентны и для морских свинок, но описаны отдельные изоляты *subsp. microti*, обладающие вирулентностью для морских свинок на уровне единичных клеток, как и штаммы основного подвида. Сравнительный анализ таких близкородственных, но принципиально отличающихся по хозяйской специфичности штаммов может выявить новые факторы патогенности, специфичные в отношении морской свинки и/или человека, – потенциальные молекулярные мишени для профилактики и лечения чумы. В ходе предварительной анимализации были отобраны две культуры *Y. pestis subsp. microti* *bv. ulegeica* штамма И-3189, отличающиеся по величинам LD₅₀ при подкожном заражении морских свинок. LD₅₀ культуры, не пассированной на этом виде животных, превышала 10⁶ КОЕ, а величина этого показателя у анимализированной культуры составила 68 КОЕ. Предположение о том, что повышение вирулентности было вызвано селекцией в организме животных спонтанных мутантов, не подтвердилось, так как проведенное нами двукратное полногеномное секвенирование различий в геноме двух культур не выявило. Мы предположили, что различия в вирулентности связаны с различным уровнем экспрессии отдельных генов. В данной работе представлены результаты транскриптомного анализа двух культур штамма И-3189 (сборка GenBank JYJX00000000.1), принципиально отличающихся по вирулентности при подкожном заражении морских свинок.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, транскриптом, дифференциальная экспрессия, избирательная вирулентность, RNA-seq, *in vivo*

Для цитирования: Соломенцев В.И., Кадникова Л.А., Кисличкина А.А., Майская Н.В., Комбарова Т.И., Платонов М.Е., Богун А.Г., Анисимов А.П. Сравнительное секвенирование транскриптомов культур *Yersinia pestis subsp. microti* *bv. ulegeica*, отличающихся по вирулентности для морских свинок. Бактериология. 2017; 2(2): 30–35. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-30-35

Comparative sequencing of transcriptomes of *Yersinia pestis subsp. microti* *bv. ulegeica*, different by virulence for guinea pigs

V.I.Solomentsev, L.A.Kadnikova, A.A.Kislichkina, N.V.Mayskaya,
T.I.Kombarova, M.E.Platonov, A.G.Bogun, A.P.Anisimov

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

Gram-negative bacteria *Yersinia pestis* is the causative agent of the plague. The species includes two subspecies: the main *subsp. pestis* is one of the most dangerous bacterial pathogens that has killed hundreds of millions of humans, while the non-main *subsp. microti* is the cause only of extremely rare plague-like endemic disease not transmitted from one person to another. Strains of this group are conditionally pathogenic for humans and as a rule are avirulent for guinea pigs, but some isolates of *subsp. microti* are virulent for guinea pigs at the level of single cells as the strains of the main subspecies. A comparative analysis of such closely related strains that are fundamentally different in host specificity can reveal new pathogenicity factors specific for guinea pig and/or human – potential molecular targets for the prevention and treatment of plague. During the preliminary animalization, two cultures of *Y. pestis subsp. microti* *bv. ulegeica* strain I-3189, differing in subcutaneous LD₅₀ values for guinea pigs were selected. LD₅₀ for culture that did not overcome contact with the organism of this species of animals

Для корреспонденции:

Соломенцев Виктор Иванович, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

Адрес: 142279, Оболенск, Серпуховский район, Московская область, Российская Федерация
Телефон: (4967) 31-2018
E-mail: Solomentsev@obolensk.org

Статья поступила 24.04.2017 г., принята к печати 30.06.2017 г.

For correspondence:

Viktor I. Solomentsev, Junior Researcher of Department Collection Microorganisms for Science of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967)31-2018
E-mail: Solomentsev@obolensk.org

The article was received 24.04.2017, accepted for publication 30.06.2017

exceeded 10^6 CFU, and the value of this indicator in the animalized culture was 68 CFU. The assumption that the increase in virulence was due to the selection of spontaneous mutants in the animals was not confirmed, since no differences in the genomes of the two cultures were found. We hypothesized that dissimilarities in virulence are associated with different levels of expression of individual genes. This abstract presents the results of a transcriptome analysis of the two cultures of the strain I-3189 (GenBank assembly JYJX00000000.1), which dramatically differs in subcutaneous virulence for guinea pigs.

Keywords: *Yersinia pestis*, transcriptome, differential expression, selective virulence, RNA-seq, in vivo

For citation: Solomentsev V.I., Kadnikova L.A., Kislichkina A.A., Mayskaya N.V., Kombarova T.I., Platonov M.E., Bogun A.G., Anisimov A.P. Comparative sequencing of transcriptomes of *Yersinia pestis subsp. microti* bv. *ulegeica*, different by virulence for guinea pigs. *Bacteriology*. 2017; 2(2): 30–35. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-30-35

Чума – острая зоонозная инфекция, возбудителем которой является грамотрицательная бактерия *Y. pestis*. Вид *Y. pestis* произошел от возбудителя псевдотуберкулеза *Yersinia pseudotuberculosis*, приобретя путем горизонтального переноса 32 хромосомных гена, две дополнительные плазмиды и потеряв около 200 генов [1], что привело к превращению энтеропатогенной бактерии с фекально-оральным путем передачи в возбудителя генерализованной септической инфекции – чумы, передающейся кровососущими насекомыми – блохами.

Вид *Y. pestis* включает два подвида, различающиеся по эпидемической значимости. Основной подвид *pestis* вызывает у людей острую высококонтагиозную инфекцию с высокой смертностью, быстрой генерализацией инфекционного процесса, а неосновной подвид *microti*, циркулирующий в популяциях различных видов полевок, вирулентен для своих основных хозяев и лабораторных мышей, но, за редким исключением, авирулентен для морских свинок и человека [2–4]. Большинство «полевочьих» штаммов из нашей коллекции выделено в природных очагах чумы, расположенных вне территории РФ еще до распада СССР. Как показывает практика, штаммы патогенных бактерий во время многолетнего коллекционного хранения часто утрачивают целый ряд своих признаков, описанных при выделении. В первую очередь, это касается снижения доли микробных клеток, сохранивших вирулентность и/или иммуногенность на исходном уровне [2]. Действительно, из 60 проверенных музейных штаммов лишь 13 сохранили вирулентность для мышей [2]. В ходе последующей анимализации были отобраны две культуры *Y. pestis subsp. microti* bv. *ulegeica* штамма И-3189, отличающиеся по величинам LD_{50} при подкожном заражении морских свинок. LD_{50} культуры, не пассированной на этом виде животных, превышала 10^6 КОЕ, а величина этого показателя у анимализированной культуры составила 68 КОЕ [2]. С целью поиска мутаций, определяющих повышение вирулентности, мы провели двукратное полногеномное секвенирование выделенных культур штамма И-3189. Секвенирование было проведено на платформах Ion Torrent PGM и Illumina MiSeq. Однако предположение о том, что повышение вирулентности было вызвано селекцией в организме животных спонтанных мутантов, не подтвердилось, так как оба полногеномных анализа различий в геноме двух культур не выявили. Мы предположили, что различия в вирулентности связаны с различным уровнем экспрессии отдельных генов. В данной работе представлены результаты транскриптомного анализа двух культур штамма И-3189, прин-

ципально отличающихся по вирулентности при подкожном заражении морских свинок.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы

В работе использовали две культуры *Y. pestis subsp. microti* bv. *ulegeica* штамма И-3189 (сборка GenBank JYJX00000000.1) из «Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск)», отличающихся по вирулентности более чем на 5 порядков [2]. Штаммы выращивали в течение 48 ч при температуре 28°C на плотных и жидких питательных средах Хоттингера (производства ФБУН ГНЦ ПМБ) и ВНИ (Brain Heart Infusion производства HiMedia, Индия).

Лабораторные животные

Использовали 4 беспородных морских свинок обоего пола (225 ± 25 г (две свинки для вирулентной культуры и две свинки для авирулентной культуры чумного микроба) из питомника филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, Солнечногорский район, п. Андреевка (Московская область). В полость брюшины морских свинок помещали наполненные бактериями камеры из диализных мембран. Основным достоинством такого подхода является относительная легкость выделения бактериальных РНК. Беспородных морских свинок в возрасте 5–6 мес анестезировали однократной внутривентриальной инъекцией смеси (5 : 1) рометара (20 мг/мл) и Золитила-100 (100 мг/мл) по 0,75 мл/кг массы тела. Диализные камеры имплантировали в перитонеальные полости морских свинок со строгим соблюдением правил асептики и антисептики. Использовали нитроцеллюлозную диализную мембрану (Sigma-Aldrich D9652-100FT) (размер пор 10 500 НОММ, ширина 33 мм), наполненную 5 мл ВНИ бульона с 1% БСА, содержащего 10^7 КОЕ *Y. pestis* в логарифмической фазе роста. Через 48 ч после имплантации проводили эвтаназию животных ингаляцией двуокиси углерода с последующей цервикальной дислокацией, а затем извлекали диализные камеры. Извлеченные камеры тщательно промывали стерильным ВНИ бульоном, а затем извлекали содержимое шприцем.

Протоколы экспериментов на животных были одобрены Комитетом по биоэтике ГНЦ ПМБ (разрешение № ВП-2016/1). Все работы проводили в соответствии с руководством и правилами Евросоюза по обращению, уходу и защите лабораторных животных (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm).

Выделение РНК

300 мкл содержимого диализной камеры использовали для выделения РНК. Для стабилизации матричной РНК в клетках *Y. pestis* использовали RNAProtect Bacteria Reagent (Qiagen, Нидерланды). Для экстракции РНК использовали PureLink® RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Для улучшения результатов секвенирования транскрипционной РНК при подготовке образцов использовали набор для удаления рибосомной РНК Ribo-Zero Kit (Bacteria) (Illumina, США), удаляющий до 99% крупных и от 85% до 95% малых рРНК.

Секвенирование

Приготовление библиотек для секвенирования проводили с помощью набора ScriptSeq™ v2 RNA-Seq Library Preparation Kit (Illumina, США). В результате получили четыре библиотеки последовательностей, характеризующих транскриптомы выделенных из разных морских свинок авирулентной (AV1 и AV2) и вирулентной (V1 и V2) культур. Секвенирование проводили на платформе Illumina MiSeq с использованием набора MiSeq Reagent Kit v3 (150 cycle) в соответствии с рекомендациями производителя (Illumina, США).

Анализ данных

Полученные данные выравнивали с использованием метода нормализации RPKM (reads per kilobase per million of mapped reads – число прочтений на тысячу нуклеотидов на миллион картированных прочтений) [5] в приложении SeqMan NGen программы Lasergene Genomics Suite (DNASTAR, США), в качестве референсной была использована полногеномная последовательность штамма CO92 (сборка GenBank NC_003143.1).

Результаты и обсуждение

В таблице 1 представлены данные, полученные после проведения секвенирования на платформе Illumina MiSeq.

Для достоверного сравнения результатов транскриптомного анализа полученный массив данных секвенирования был нормализован в приложении SeqMan NGen программы Lasergene Genomics Suite (DNASTAR) с использованием метода нормализации RPKM. В качестве референсной была использована полногеномная последовательность штамма CO92.

Для анализа дифференциальной экспрессии генов сравнили полученные данные для авирулентных и вирулентных культур. Сравнение всех пар представлено в таблице 2.

На первом этапе анализа, в целях достоверного сравнения полученных результатов, из выборки генов были исключены гены с количеством картированных прочтений 3 и менее. Далее были найдены средние значения уровня экспрессии для авирулентных и вирулентных культур. По результатам сравнения средних значений уровня экспрессии были отобраны гены, кратность изменения экспрессии которых была 4 и выше. Всего отобрали 59 дифференциально экспрессируемых генов. Из них в культурах, вирулентных для морских свинок, у 51 гена уровень экспрессии увеличился, а у 8 – уменьшился.

В таблице 3 представлены гены с 4-кратным и более изменением уровня экспрессии в вирулентных и авирулентных культурах.

Вирулентность бактерий обусловлена присутствием у них факторов патогенности различной функциональной направленности [6]. Транскрипционная регуляция экспрессии генов координируется специальными регуляторными системами, позволяя приспосабливаться бактериям к изменяющимся условиям внешней среды [7].

Установлено, что *Y. pestis* способна координировать экспрессию большого количества генов для выживания в широком спектре изменяющихся условий. Так, анализ профилей экспрессии генов, связанных с вирулентностью, показал различия при изменении температуры [7]. Дифференциальная экспрессия генов при двух разных температурах позволяет бактерии эффективно адаптироваться в организмах холоднокровного насекомого-переносчика и теплокровного хозяина. В качестве примера зависимости регуляции генов от температуры и других физических характеристик окружающей среды можно привести ген *umt*, кодирующий мышинный токсин, – он репрессируется при повышении температуры [7]. Антиген рН 6 (PsaA) экспрессируется *in vitro* при рН среды 5–6 и температуре (38 ± 3)°С, т.е. в условиях, близких к таковым в фагоцитарных фаголизосомах. Оперон капсульного антигена F1 активируется при повышении температуры, окислительном стрессе и низком содержании Mg²⁺ [7]. Вышеперечисленные динамические изменения экспрессии генов осуществляются посредством факторов транскрипции и небольших регуляторных РНК на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях [7].

В ходе работ по тестиккулярной анимализации полевочьих штаммов *Y. pestis* мы отобрали уникальную пару культур штамма И-3189, в которой исходные культуры были авирулентны для морских свинок (LD₅₀ >10⁶ КОЕ), а их пассированное *in vivo* «потомство» вызывало гибель животных этого вида при заражении несколькими десятками КОЕ [2]. Проведенное нами двукратное полногеномное секвенирование на платформах Illumina MiSeq и Ion Torrent PGM не выявило различий в нуклеотидных последовательностях исходных и пассированных культур. Исходя из этого, мы предположили, что изменение вирулентности вызвано различным уровнем экспрессии генов.

Для определения различия уровней экспрессии генов высоковирулентной и авирулентной культур штамма И-3189

Таблица 1. Результаты секвенирования библиотек AV1, AV2, V1, V2

Библиотека	Объем, Мб	Прочтений всего	Содержание ГЦ, %
AV1	610	3 070 202	47
AV2	817	4 111 377	47
V1	762	3 830 891	46
V2	1003	5 307 849	47

Таблица 2. Кратность изменения уровня экспрессии генов в сравниваемых парах культур

Пары культур	Количество генов с 2-кратным уровнем изменения экспрессии	Количество генов с 4-кратным уровнем изменения экспрессии	Количество генов с 8-кратным уровнем изменения экспрессии
AV1-V1	978	215	67
AV1-V2	781	158	51
AV2-V1	1307	311	110
AV2-V2	739	162	51

Таблица 3. Гены с 4-кратным и более изменением уровня экспрессии в вирулентных и авирулентных культурах

Название гена	Средний уровень экспрессии авирулентных культур, в скобках показано расхождение между повторностями	Средний уровень экспрессии вирулентных культур, в скобках показано расхождение между повторностями	Изменение экспрессии генов в вирулентных культурах, среднее	Продукт
<i>YPO3518</i>	1301,25 (± 117,79)	12631,19 (± 3747,54)	9,71 ↑	hypothetical protein
<i>YPO2027a</i>	12,21 (± 2,56)	99,89 (± 31,59)	8,18 ↑	hypothetical protein
<i>cysM</i>	1,13 (± 0,42)	7,31 (± 0,32)	6,47 ↑	cysteine synthase B
<i>lepA</i>	24,78 (± 12,35)	158,69 (± 66,15)	6,41 ↑	membrane protein
<i>YPO0816</i>	4,64 (± 2,10)	28,20 (± 17,41)	6,08 ↑	general secretion pathway protein D
<i>YPO3137</i>	656,27 (± 224,95)	3928,40 (± 1085,28)	5,99 ↑	conserved hypothetical protein
<i>aroF</i>	145,10 (± 63,55)	858,46 (± 92,32)	5,92 ↑	phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, tyr-sensitive
<i>YPO2169</i>	1,63 (± 0,07)	9,60 (± 4,36)	5,88 ↑	putative LysR-family transcriptional regulatory protein
<i>YPO0968a</i>	13,58 (± 5,61)	79,64 (± 37,04)	5,87 ↑	hypothetical protein
<i>YPO3612</i>	98,28 (± 42,49)	575,94 (± 185,32)	5,86 ↑	putative transcriptional regulatory protein
<i>YPO1107</i>	1245,53 (± 32,43)	7293,39 (± 1441,00)	5,86 ↑	heat shock protein GrpE
<i>YPO4032</i>	21,24 (± 6,54)	123,43 (± 61,21)	5,81 ↑	hypothetical protein
<i>YPO0788</i>	28,98 (± 6,14)	167,02 (± 122,41)	5,76 ↑	hypothetical protein
<i>b4390</i>	73,55 (± 4,92)	422,11 (± 60,58)	5,74 ↑	transcriptional regulator NadR
<i>YPO2220</i>	6,06 (± 0,75)	34,40 (± 12,86)	5,68 ↑	hypothetical protein
<i>YPO1484a</i>	5,59 (± 4,16)	31,73 (± 15,46)	5,67 ↑	hypothetical protein
<i>YPM1.67c</i>	366,95 (± 183,09)	2060,30 (± 991,41)	5,61 ↑	partitioning protein B
<i>ygiW</i>	481,78 (± 118,52)	2610,00 (± 53,13)	5,42 ↑	putative exported protein
<i>YPO0750</i>	6,61 (± 2,55)	35,58 (± 23,71)	5,38 ↑	putative membrane protein
<i>YPO1656</i>	12,90 (± 2,03)	69,25 (± 17,63)	5,37 ↑	conserved hypothetical protein
<i>YPM1.34A</i>	481,48 (± 129,49)	2539,67 (± 552,41)	5,27 ↑	hypothetical protein
<i>YPO2217a</i>	82,66 (± 19,26)	434,94 (± 157,82)	5,26 ↑	hypothetical protein
<i>YPO0285</i>	23,75 (± 0,03)	124,92 (± 10,97)	5,26 ↑	conserved hypothetical protein
<i>YPO0695</i>	14,86 (± 4,89)	76,80 (± 19,78)	5,17 ↑	putative membrane protein
<i>YPO0499</i>	1,92 (± 0,76)	9,81 (± 4,70)	5,11 ↑	hypothetical protein
<i>YPO0884</i>	90,96 (± 25,07)	456,70 (± 185,50)	5,02 ↑	hypothetical protein
<i>YPO1174</i>	3,40 (± 0,86)	17,00 (± 6,58)	5,00 ↑	hypothetical protein
<i>YPO3682</i>	3,21 (± 1,85)	15,94 (± 8,66)	4,97 ↑	putative LysR-family transcriptional regulatory protein
<i>fldA</i>	56,87 (± 11,78)	280,50 (± 61,47)	4,93 ↑	flavodoxin 1
<i>YPO0809</i>	2,36 (± 1,13)	11,15 (± 1,72)	4,72 ↑	general secretion pathway protein K
<i>YPO0626</i>	43,92 (± 21,10)	206,64 (± 92,21)	4,70 ↑	conserved hypothetical protein
<i>YPO1382</i>	51,72 (± 19,75)	240,91 (± 82,61)	4,66 ↑	hypothetical protein
<i>nadA</i>	76,23 (± 3,47)	354,19 (± 6,72)	4,65 ↑	quinolinate synthetase A
<i>YPM1.68c</i>	881,40 (± 534,98)	4076,15 (± 1827,36)	4,62 ↑	partitioning protein A
<i>cyoA</i>	87,70 (± 3,31)	403,99 (± 52,08)	4,61 ↑	cytochrome O ubiquinol oxidase subunit II
<i>nrdH</i>	24,21 (± 9,27)	111,40 (± 26,75)	4,60 ↑	putative glutaredoxin
<i>hsIV</i>	282,60 (± 88,95)	1288,29 (± 43,11)	4,56 ↑	heat shock protein
<i>YPO0286</i>	21,49 (± 0,83)	95,38 (± 21,44)	4,44 ↑	putative coproporphyrinogen III oxidase
<i>YPO3258</i>	42,50 (± 9,71)	187,94 (± 105,49)	4,42 ↑	putative membrane protein
<i>YPO1891</i>	3,17 (± 0,30)	13,81 (± 2,46)	4,35 ↑	hypothetical protein
<i>YPO0127</i>	165,67 (± 27,22)	716,06 (± 86,61)	4,32 ↑	conserved hypothetical protein
<i>YPO3023</i>	25,69 (± 2,87)	109,86 (± 47,81)	4,28 ↑	conserved hypothetical protein
<i>YPO1234</i>	289,83 (± 210,10)	1238,23 (± 642,28)	4,27 ↑	probable phage antitermination protein Q
<i>ffs</i>	333,41 (± 81,06)	1412,04 (± 585,49)	4,24 ↑	putative 6-O-methylguanine DNA methyltransferase family protein
<i>YPO2483</i>	40,54 (± 4,32)	170,62 (± 59,30)	4,21 ↑	hypothetical protein
<i>YPO0864</i>	80,78 (± 8,10)	337,63 (± 56,26)	4,18 ↑	conserved hypothetical protein
<i>YPO0871</i>	5,00 (± 0,86)	20,55 (± 14,23)	4,11 ↑	putative colicin immunity protein
<i>YPO1387</i>	6,04 (± 3,12)	24,69 (± 9,87)	4,09 ↑	putative exported protein
<i>YPO0538</i>	16,61 (± 5,97)	67,67 (± 27,05)	4,08 ↑	hypothetical protein
<i>gpm</i>	294,16 (± 43,71)	1190,01 (± 15,90)	4,05 ↑	putative phosphoglycerate mutase
<i>glnA</i>	181,89 (± 14,96)	730,07 (± 235,40)	4,01 ↑	glutamine synthetase
<i>ansB</i>	306,39 (± 113,92)	75,87 (± 39,60)	4,00 ↓	putative L-asparaginase II precursor
<i>YPO3620</i>	12,65 (± 0,61)	3,06 (± 1,86)	4,17 ↓	putative carbohydrate transport protein
<i>YPO3636</i>	14,02 (± 3,30)	2,95 (± 2,01)	4,76 ↓	putative ABC transporter, permease protein
<i>YPO0412</i>	23,03 (± 3,87)	4,51 (± 1,47)	5,00 ↓	putative ABC transporter ATP-binding protein
<i>fucR</i>	67,87 (± 42,48)	12,05 (± 9,83)	5,56 ↓	putative deoR-family regulatory protein
<i>gntP</i>	35,36 (± 1,62)	5,37 (± 2,01)	6,67 ↓	putative gluconate transporter
<i>psaA</i>	590,08 (± 111,53)	85,59 (± 1,94)	6,67 ↓	pH 6 antigen precursor (antigen 4) (adhesin)
<i>pst</i>	15179,03 (± 14565,54)	1167,41 (± 12,59)	12,50 ↓	pesticin

решили использовать культивирование бактерий в диализных камерах, имплантированных в полость брюшины морских свинок, – модель, наиболее приближенную к условиям существования бактерий в организме хозяина.

В настоящей публикации описано проведение сравнительного транскриптомного анализа двух культур одного штамма *Y. pestis*, отличающихся по вирулентности более чем на пять порядков. В ходе проведенной работы мы обнаружили ряд генов со схожими уровнями изменения экспрессии в двух повторностях. Большая часть отобранных генов кодирует гипотетические белки, тем не менее, мы обнаружили понижение уровня экспрессии у гена *psaA*, который входит в состав оперона, кодирующего рН 6 антиген, обладающий антифагоцитарной и адгезивной активностями [8]. Возможно, снижение адгезивности бактериальных клеток способствует диссеминации бактерий в организме морской свинки, следствием чего являются генерализация инфекционного процесса и гибель животного.

У расположенного на плазмиде pPst гена *pst*, кодирующего синтез пестицина, уровень экспрессии в вирулентных культурах снизился в среднем в 12,5 раз. Показано, что рецептор пестицина Psn является одновременно рецептором комплекса железо-иерсиниабактин [9]. Вероятно, снижение продукции пестицина снижает конкуренцию за посадку на общие рецепторы и, соответственно, увеличивает количество доступного для бактерии железа. Также экспрессия снизилась у генов *YPO3636* и *YPO0412*, кодирующих различные белки суперсемейства транспортных белков ABC; гена *ansB*, кодирующего L-аспарагиназу II, фермент, способный ингибировать ответ Т-клеток и опосредующий вирулентность [10].

Чтобы достоверно определить, отвечают ли эти гены за избирательную вирулентность чумного микроба, необходимо провести анализ транскриптома культур других штаммов, также изменяющих свойства после пассажей, и/или посредством нокаутного мутагенеза и последующей комплементации проанализировать все гены – потенциальные молекулярные мишени для профилактики и лечения чумы.

Благодарности

Работа выполнена в рамках проекта РНФ № 14-15-00599 «Поиск факторов избирательной вирулентности полевочных штаммов *Yersinia pestis*».

Литература

1. Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A, Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudo-tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Nov 23;96(24):14043-8.
2. Анисимов НВ, Комбарова ТИ, Платонов МЕ, Иванов СА, Сухова МА, Дентовская СВ, Анисимов АП. Способ отбора филогенетически близких штаммов *Yersinia pestis*, отличающихся по вирулентности для морских свинок. Инфекция и иммунитет. 2015;5(4):373-376. DOI: 10.15789/2220-7619-2015-4-373-376.
3. Anisimov AP, Lindler LE, Pier GB. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. Clin Microbiol Rev. 2004 Apr;17(2):434-64.
4. Cui Y., Yu C, Yan Y, Li D, Li Y, Jombart T, et al. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jan 8;110(2):577-82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110

5. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNAseq. Nat Methods. 2008 Jul;5(7):621-8. DOI: 10.1038/nmeth.1226
6. Анисимов АП. Молекулярно-генетические механизмы образования и функциональная значимость капсулы *Yersinia pestis*. Автореферат, 2000.
7. Yanping R, Du Z, Han Y, Zhou L, Song Y, Zhou D, Cui Y. Omics strategies for revealing *Yersinia pestis* virulence. Front Cell Infect Microbiol. 2012 Dec 13;2:157. doi: 10.3389/fcimb.2012.00157
8. Ценева ГЯ, Солодовникова НЮ, Воскресенская ЕА. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2002;4(3).
9. Анисимов АП. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2002;3:3-23.
10. Kullas AL, McClelland M, Yang HJ, Tam JW, Torres A, Porwollik S, et al. L-asparaginase II produced by *Salmonella typhimurium* inhibits T cell responses and mediates virulence. Cell Host Microbe. 2012 Dec 13;12(6):791-8. DOI: 10.1016/j.chom.2012.10.018

References

1. Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A, Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudo-tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Nov 23;96(24):14043-8.
2. Anisimov AP, Kombarova TI, Platonov ME, Ivanov SA, Sukhova MA, Dentovskaya SV, Anisimov AP. Selection of phylogenetically closely-related *Yersinia pestis* strains differing in their virulence for guinea pigs. Russian Journal of Infection and Immunity. 2015;5(4):373-376. DOI: 10.15789/2220-7619-2015-4-373-376. (In Russian).
3. Anisimov AP, Lindler LE, Pier GB. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. Clin Microbiol Rev. 2004 Apr;17(2):434-64.
4. Cui Y., Yu C, Yan Y, Li D, Li Y, Jombart T, et al. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jan 8;110(2):577-82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110
5. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNAseq. Nat Methods. 2008 Jul;5(7):621-8. DOI: 10.1038/nmeth.1226
6. Anisimov AP. Molecular-genetic mechanisms of formation and functional significance of the capsule of *Yersinia pestis*. Abstract, 2000. (In Russian).
7. Yanping R, Du Z, Han Y, Zhou L, Song Y, Zhou D, Cui Y. Omics strategies for revealing *Yersinia pestis* virulence. Front Cell Infect Microbiol. 2012 Dec 13;2:157. doi: 10.3389/fcimb.2012.00157
8. Tseneva GYa, Solodovnikova NYu, Voskresenskaya EA. Molekulyarnye aspekty virulentnosti iersinii. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2002;4(3). (In Russian).
9. Anisimov AP. *Yersinia pestis* factors, assuring circulation and maintenance of the plague pathogen in natural foci ecosystems. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2002;3:3-23. (In Russian).
10. Kullas AL, McClelland M, Yang HJ, Tam JW, Torres A, Porwollik S, et al. L-asparaginase II produced by *Salmonella typhimurium* inhibits T cell responses and mediates virulence. Cell Host Microbe. 2012 Dec 13;12(6):791-8. DOI: 10.1016/j.chom.2012.10.018

Информация об авторах:

Кадникова Лидия Александровна, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
 Адрес: 142279, Оболенск, Серпуховский район, Московская область, Российская Федерация
 Телефон: (4967)31-2018
 E-mail: Kadnikova@obolensk.org

Кисличкина Ангелина Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
Адрес: 142279, Оболенск, Серпуховский район, Московская область, Российская Федерация
Телефон: (4967) 31-2018
E-mail: Kislichkina@obolensk.org

Майская Надежда Васильевна, научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
Адрес: 142279, Оболенск, Серпуховский район, Московская область, Российская Федерация
Телефон: (4967) 31-2018
E-mail: Mayskaya@obolensk.org

Комбарова Татьяна Ивановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
Адрес: 142279, Оболенск, Серпуховский район, Московская область, Российская Федерация
Телефон: (4967) 36-0003

Платонов Михаил Евгеньевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
Адрес: 142279 Оболенск, Серпуховский район, Московская область, Российская Федерация
Телефон: (4967) 36-0003

Богун Александр Геннадьевич, кандидат биологических наук, начальник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
Адрес: 142279, Оболенск, Серпуховский район, Московская область, Российская Федерация
Телефон: (4967) 31-2018
E-mail: bogun62@mail.ru

Анисимов Андрей Павлович, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
Адрес: 142279, Оболенск, Серпуховский район, Московская область, Российская Федерация
Телефон: (4967) 36-0003

Information about authors:

Lidiya A. Kadnikova, Junior Researcher of Department Collection Microorganisms for Science of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2018
E-mail: Kadnikova@obolensk.org

Angelina A. Kislichkina PhD (biol.), Senior researcher of Department Collection Microorganisms for Science of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2018
E-mail: Kislichkina@obolensk.org

Nadezhda V. Mayskaya, Researcher of Department Collection Microorganisms for Science of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2018
E-mail: Mayskaya@obolensk.org

Tat'yana I. Kombarova, PhD (biol.), Senior Researcher, Laboratory for Biological Testing, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Mikhail E. Platonov, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory for Plague Microbiology, Department of Especially Dangerous Infectious Diseases, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Aleksandr G. Bogun, PhD (biol.), Head of Department collection microorganisms for Science of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2018
E-mail: bogun62@mail.ru

Andrey P. Anisimov, M.D., PhD (Medicine), ScD (Medicine), Prof., deputy director for science of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003



Уважаемые коллеги! ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

приглашает Вас пройти обучение на курсах повышения квалификации

Обучение предусматривает:

- повышение квалификации по микробиологии, биологической безопасности и лабораторной диагностике от 72 до 344 часов;
- профессиональная переподготовка по бактериологии более 500 часов;

Образовательный цикл по программам дополнительного образования включает: лекции, семинары, практические занятия, собеседования, индивидуальные задания, изучение специальной литературы.

Учебно-методическое оснащение учебного процесса обеспечивается наличием методических пособий и рекомендаций по всем разделам подготовки, а также наглядными пособиями, аудио- и видеоматериалами.

Для обеспечения практической и теоретической подготовки предусматривается необходимое количество помещений, оборудованных в соответствии с требованиями биологической безопасности.

Читают лекции и ведут практические занятия ведущие специалисты института, имеющие многолетний опыт научно-практической работы.

По окончании курсов слушателям выдаются соответствующие документы установленного образца (на основании лицензии на осуществление образовательной деятельности в области ДПО №1912 от 4 октября 2011г.).

Контактная информация:

Потапов Василий Дмитриевич - *заведующий отделом подготовки и усовершенствования специалистов*, д.б.н. тел.: +7 (916) 521-66-53

Кузин Виктор Владимирович - *инженер отдела подготовки и усовершенствования специалистов* тел.: 7 (4967) 31-21-82

E-mail: kuzin@obolensk.org

Подробная информация

www.obolensk.org Дополнительное профессиональное образование



Способ культивирования дифтерийных микробов

Г.Г.Харсеева¹, Э.Л.Алутина¹, А.П.Шепелин², О.В.Полосенко², Т.Д.Гасретова¹

¹ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Российская Федерация;

²ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, п. Оболensk, Российская Федерация

При культивировании штаммов коринебактерий предлагаемым способом на двухфазной питательной среде в течение 17 ч количество выросших колоний (97–124) значительно превышало таковое при культивировании на кровяном теллуриновом агаре (0–5 колоний). Разработанный способ культивирования коринебактерий на двухфазной питательной среде имеет преимущество перед обычными методами культивирования на кровяном теллуриновом агаре, позволяя обеспечить оптимальные условия для роста коринебактерий. Реализация данного способа культивирования приводит к увеличению скорости роста и количества колоний коринебактерий даже при их малом содержании в исследуемом материале.

Ключевые слова: *Corynebacterium diphtheriae*, двухфазная питательная среда, способ культивирования

Для цитирования: Харсеева Г.Г., Алутина Э.Л., Шепелин А.П., Полосенко О.В., Гасретова Т.Д. Способ культивирования дифтерийных микробов. Бактериология. 2017; 2(2): 36–38. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-36-38

The method of cultivation of diphtheria microbes

G.G.Kharseeva¹, E.L.Alutina¹, A.P.Shepelin², O.V.Polosenko², T.D.Gasretova¹

¹Rostov State Medical University, Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation

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

When cultured strains of *Corynebacterium* proposed method on bephase nutrient medium for 17 hours the number of colonies (97–124) significantly exceeded itself when cultured on blood agar tellurium (0–5 colonies). Developed a method of culturing *Corynebacterium* on bephase nutrient medium has the advantage over conventional cultivation methods on covenantalism, allowing you to provide optimal conditions for the growth of *Corynebacterium*. The implementation of this method of cultivation leads to an increase in the rate of growth and number of colonies of *Corynebacterium*, even with their small content in the material.

Keywords: *Corynebacterium diphtheriae*, bephase nutrient medium, the method of cultivation

For citation: Kharseeva G.G., Alutina E.L., Shepelin A.P., Polosenko O.V., Gasretova T.D. The method of cultivation of diphtheria microbes. Bacteriology. 2017; 2(2): 36–38. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-36-38

Заболеваемость дифтерией в современных условиях носит спорадический характер [1, 2]. По мере снижения заболеваемости дифтерией роль больных как источников инфекции уменьшается, переходя к носителям, поэтому ликвидация дифтерии невозможна, несмотря на проводимую вакцинацию [3, 4]. Положение усугубляется и недостатками в бактериологической диагностике. У каждого третьего больного диагноз устанавливается без бактериологического подтверждения [4]. Система эпидемиологического надзора за дифтерийной инфекцией в России предусматривает

наблюдение за биологическими свойствами дифтерии – токсигенными *Corynebacterium diphtheriae* [1]. В связи с этим необходимо разрабатывать не только новые методы диагностики дифтерийной инфекции и питательные среды, но и способы культивирования дифтерийных микробов, которые позволили бы выявлять возбудителя дифтерии не только у больных, но и носителей, при незначительном их содержании в исследуемом материале.

Целью исследования явилась разработка высокоэффективного способа культивирования дифтерийных микробов.

Для корреспонденции:

Харсеева Галина Георгиевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии и вирусологии №2 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России
Адрес: 344022, Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29
Телефон: (863) 250-4109
E-mail: galinagh@bk.ru

Статья поступила 07.05.2017 г., принята к печати 30.06.2017 г.

For correspondence:

Galina G. Kharseeva, Sc.D. (Med), Professor, Head of Department of Microbiology and Virology No. 2 of Rostov State Medical University
Address: 29 Nakhichevanskiy lane, Rostov-on-don, 344022, Russia Federation
Phone: (863) 250-4190
E-mail: galinagh@bk.ru

The article was received 07.05.2017, accepted for publication 30.06.2017

Материалы и методы

В качестве исследуемого материала использовали 21 штамм коринебактерий, из них: 4 штамма *Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae gravis tox* + № 665, *C. diphtheriae mitis tox* + № 6765, *C. diphtheriae mitis tox* + № 269, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ) Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научно-медицинский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича», *C. diphtheriae gravis tox* +, выделенный от больного с диагнозом «локализованная форма дифтерии» бактериологической лабораторией ФГУ «1002 ЦГСЭН СКВО» Минобороны России г. Ростова-на-Дону) и 17 штаммов недифтерийных коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum* – 7 шт., *C. xerosis* – 8 шт., *C. pseudotuberculosis* – 2 шт.), выделенных из верхних дыхательных путей от больных острым и хроническим тонзиллитами, фарингитами, ОРВИ, полученных из лаборатории бактериологических методов исследования МУЗ «Городская больница №1» г. Гуково Ростовской области и ГУЗ КДЛ ОДБ г. Ростова-на-Дону.

Для культивирования дифтерийных бактерий использовали кровяной теллуритовый агар (КТА) и двухфазную питательную среду, которую готовили в соответствии с указаниями [5, 6], содержащую жидкую и твердую фазы в объемном соотношении 1 : 3. Посев 0,1 мл микробной взвеси исследованных штаммов коринебактерий производили из разведений 10^{-7} и 10^{-8} , содержащих 100 и 10 м.к./мл соответственно, на КТА и двухфазную питательную среду. При посеве на двухфазную питательную среду исследуемый материал вносили в жидкую фазу питательной среды. Инкубацию выполняли трехкратно при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в термостате. Первый раз посев инкубировали в течение 4,0 ч при вертикальном положении емкости. После этого содержимое жидкой фазы перемешивали, емкость с двухфазной питательной средой устанавливали в наклонное положение таким образом, чтобы жидкая фаза питательной среды полностью смачивала всю поверхность твердой фазы. Затем посев при наклонном положении повторно инкубировали в течение 0,5 ч. Далее емкость с посевом устанавливали в вертикальное положение и инкубировали третий раз в течение 12,5 ч. Общее время культивирования дифтерийных микробов на КТА и двухфазной питательной среде составило 17,0 и 24,0 ч.

Учет количества колоний, выросших после культивирования исследованных штаммов коринебактерий, производили визуально.

Результаты и обсуждение

По результатам проведенных исследований (таблица) установлено, что при культивировании указанным способом на двухфазной питательной среде исследованных штаммов коринебактерий в посеве из разведений 10^{-7} в течение уже 17 ч выросло значительное количество колоний – от 97 до 124. При регистрации количества колоний на этой питательной среде через 24 ч количество колоний коринебактерий увеличивалось незначительно (от 103 до 129), но размеры их становились больше (до 1 мм при 17-часовой экспозиции культивирования; 1,0–1,5 мм – при 24-часовой). При этом в посеве

Таблица. Ростовые свойства питательных сред для культивирования коринебактерий

Питательная среда	Время культивирования, ч	Количество колоний, КОЕ	
		10^{-7}	10^{-8}
Двухфазная питательная среда	17	97–124	3–5
Кровяной теллуритовый агар	24	103–129	3–6
	17	0–5	нет роста
	24	0–5	нет роста

микробной взвеси в разведении 10^{-8} при культивировании в течение 17 ч число колоний коринебактерий составило 3–5, в течение 24 ч осталось почти таким же (3–6 колоний).

В то же время при исследовании результатов посевов микробной взвеси штаммов коринебактерий на КТА обнаружили, что количество колоний, выросших в посеве микробной взвеси в разведении 10^{-7} , как при 17-часовом культивировании, так и 24-часовом было очень небольшим (от 0 до 5 колоний). Обнаруженные колонии были мелкими (до 1 мм). В посеве микробной взвеси исследованных штаммов коринебактерий в разведении 10^{-8} роста обнаружено не было.

Результаты наших исследований показывают преимущество использования разработанного способа культивирования коринебактерий на двухфазной питательной среде по сравнению с обычными методами культивирования на КТА. Это может быть связано с введением дополнительного орошения твердой фазы питательной среды жидкой ее фазой, что позволило полностью насыщать всю поверхность твердой фазы питательным бульоном. Это, безусловно, приводило к повышению ростовых свойств предлагаемой питательной среды (скорости роста, количества выросших колоний коринебактерий) за счет сокращения логарифмической фазы роста дифтерийных микробов в процессе культивирования.

Таким образом, предлагаемый способ культивирования дифтерийных бактерий на двухфазной питательной среде позволяет обеспечить оптимальные условия для роста коринебактерий. Реализация данного способа культивирования дифтерийных микробов приводит к сокращению времени культивирования и увеличению количества колоний дифтерийных микробов при их малом содержании в исследуемом материале. По сравнению с культивированием дифтерийных микробов на среде КТА сокращается время культивирования при значительном увеличении количества выросших колоний дифтерийных микробов.

Литература

- Алутина ЭЛ, Гасретова ТД, Дятлов ИА, и др. Дифтерия: микробиологические и иммунологические аспекты. М.: Практическая медицина, 2014, 241 с.
- Корженкова МП, Малышев НА, Максимова НМ, Маркина СС, Черкасова ВВ, Шестакова ОМ, Базарова МВ. Уроки дифтерии. Биопрепараты. 2011;2:30-5.
- Харсеева ГГ, Соловьева МЮ, Ковалев ЕВ, Айдинов ГВ, Ненадская СА, Алутина ЭЛ, и др. Дифтерийная инфекция: характеристика эпидпроцесса в г. Ростове-на-Дону и Ростовской области. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014;5:36-9.
- Якимова ТН, Максимова НМ, Маркина СС. Эпидситуация по дифтерии в России и в субъектах Российской Федерации с 2005–2011 г. Бюллетень ВЦНЦ РАМН. 2012;5-1(87):131-4.
- Питательная среда для культивирования дифтерийных микробов [текст]: Пат.2549707 Рос. Федерации, МПК С 12 N1/20 С 12R1/01. Харсеева Г.Г., Шепелин А.П., Алутина Э.Л., Полосенко О.В., Садовниченко В.Н., Гасретова Т.Д.;

заявитель и патентообладатель Ростовский государственный медицинский университет (RU) - № 2014101552; заявл. 20.01.2014; опубл. 27.04.2015.

6. Харсеева ГГ, Миронов АЮ, Алутина ЭЛ. Отечественная двухфазная питательная среда для культивирования дифтерийных бактерий. Астраханский медицинский журнал. 2011;4:33-6.

References

1. Alutina EL, Gasretova TD, Dyatlov IA, et al. Differiya: mikrobiologicheskie i immunologicheskie aspekty [Diphtheria: microbiological and immunological aspects]. Moscow: "Prakticheskaya meditsina" Publ., 2014, 241 p. (In Russian).
2. Korzhenkova MP, Malyshev NA, Maksimova NM, Markina SS, Cherkasova VV, Shestakova OM, Bazarova MV. The Lessons of Diphtheria. Biopreparaty. 2011;2: 30-5. (In Russian).
3. Kharseeva GG, Solovjev MYu, Kovalev EV, Ajdinov GV, Nenadskaya SA, Alutina EL, et al. Diphtheriae Infection: Characteristic of Epidemic Process in Rostov-on-Don and Rostov Region. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2014;5:36-9. (In Russian).
4. Yakimova TN, Maksimova NM, Markina SS. Epidemiological situation of diphtheria in Russia and in the regions of the Russian Federation since 2005 to 2011. The Siberian Scientific Medical Journal. 2012;5-1(87):131-4. (In Russian).
5. Nutrient medium for cultivation of diphtheria microbes [text]: Pat.2549707 Russian Federation. MPK C 12 N1/20 C 12R1/01 Kharseeva GG, Shepelin AP, Alutina EL, Polosenko OV, Sadovnichenko VN, Gasretova TD.; applicant and patentee of the Rostov State Medical University (RU) – №2014101552; 20.01.2014; Epub. 27.04.2015. (In Russian).
6. Alutina EL, Harseeva GG, Mironov AYu. The national biphasic nutrient medium for cultivation of diphtheria bacteria. Astrakhan Medical Journal. 2011;4:33-6. (In Russian).

Информация об авторах:

Алутина Эльвира Львовна, ассистент курса «Бактериология» ФПК и ППС кафедры микробиологии и вирусологии №2 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России Адрес: 344022, Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29 Телефон: (863) 250-4109 E-mail: galinagh@bk.ru

Шепелин Анатолий Прокопьевич, заместитель директора по научно-производственной работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск Телефон: (4967) 36-0020 E-mail: shepelin@obolensk.org

Полосенко Ольга Вадимовна, заведующая сектором микробиологических исследований НПО ПС ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск Телефон: (4967) 36-0003 E-mail: info@obolensk.org

Гасретова Татьяна Дмитриевна, доцент курса «Бактериология» ФПК и ППС кафедры микробиологии и вирусологии №2 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России Адрес: 344022, Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29 Телефон: (863) 250-4109 E-mail: galinagh@bk.ru

Information about the authors:

Elvira L. Alutina, PhD (Med), assistant of the course «Bacteriology» the faculty of advanced training and retraining of specialists of Department of Microbiology and Virology No. 2 of Rostov State Medical University Address: 29 Nakhichevanskiy lane, Rostov-on-don, 344022, Russian Federation Phone: (863) 250-4190 E-mail: galinagh@bk.ru

Anatoly P. Shepelin, Sc.D. (Bio.), Deputy Director for science and production, FBIS State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation Phone: (4967) 36-0020 E-mail: shepelin@obolensk.org

Olga V. Polosenko, Head of Sector of microbiological researches, FBIS State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation Phone: (4967) 36-0003 E-mail: firstova@obolensk.org

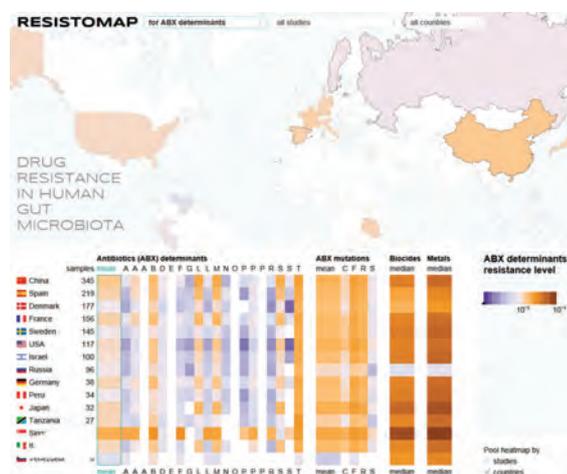
Tatyana D. Gasretova, Sc.D. (Biol.), dosent of the course «Bacteriology» the faculty of advanced training and retraining of specialists of Department of Microbiology and Virology No. 2 of Rostov State Medical University Address: 29 Nakhichevanskiy lane, Rostov-on-don, 344022, Russian Federation Phone: (863) 250-4190 E-mail: galinagh@bk.ru

НОВОСТИ НАУКИ

Мировая карта устойчивости кишечных микробов к антибиотикам

Российские ученые создали интерактивную мировую карту резистентности микробиоты кишечника к антибиотикам. ResistoMap поможет выявить национальные особенности в потреблении антибиотиков и контролировать лекарственную устойчивость в глобальном масштабе. Технология представлена в журнале Bioinformatics, а сам ресурс доступен по адресу <http://resistomap.rcpcm.org/>.

Мировая карта устойчивости кишечных микробов к антибиотикам –
 Новости науки [Electronic resource].
 URL: <http://sci-dig.ru/biology/mirovaya-karta-ustoychivosti-kishechnyih-mikrobov-k-antibiotikam/>
 (accessed: 05.07.2017).



Микробиологический контроль качества пищевой продукции

А.П.Шепелин, И.А.Дятлов, О.В.Полосенко

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

Комплексное санитарно-микробиологическое исследование пищевых продуктов включает своеобразие используемых методов для выявления степени их недоброкачественности. Микробиологические нормативы безопасности пищевых продуктов регламентированы техническими регламентами Таможенного союза и другими рекомендательными документами. Широко используемым методом оценки микробной обсемененности и выявления патогенов является высеивание на различные питательные среды для получения сравнимых, достаточно полных и гарантирующих исключение грубых ошибок интерпретации результатов исследований. Для обеспечения бактериологических лабораторий предприятий пищевой отрасли широкой номенклатурой питательных сред отечественные производители выпускают зарегистрированные в РФ питательные среды, гарантирующие их качество и стабильность.

Ключевые слова: качество, пищевая продукция, микробиологический контроль

Для цитирования: Шепелин А.П., Дятлов И.А., Полосенко О.В. Микробиологический контроль качества пищевой продукции. Бактериология. 2017; 2(2): 39–47. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-39-47

Microbiological control of food products quality

A.P.Shepelin, I.A.Dyatlov, O.V.Polosenko

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

Complex sanitary and microbiological research of food products includes the peculiarity of the methods used to determine the degree of their inferiority. Microbiological standards for food safety are regulated by the technical regulations of the Customs Union and other recommendatory documents. A widely used method for assessing microbial contamination and detecting pathogens is to seed on various nutrient media to obtain comparable, sufficiently complete and guaranteeing the elimination of gross errors in interpreting the results of the studies. To ensure the bacteriological laboratories of enterprises of the food industry with a wide range of nutrient media, domestic producers produce nutrient media registered in the Russian Federation that guarantee quality and their stability.

Keywords: quality, food products, microbiological control

For citation: Shepelin A.P., Dyatlov I.A., Polosenko O.V. Microbiological control of food products quality. Bacteriology. 2017; 2(2): 39–47. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-39-47

Постановлением Правительства Российской Федерации №1364-р от 29.06.2016 г. утверждена «Стратегия повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года», которая ориентирована на обеспечение полноценного питания, профилактику заболеваний, увеличение продолжительности и повышение качества жизни населения, стимулирование развития производства и обращения на рынке пищевой продукции надлежащего качества. Она является основой для формирования национальной системы управления качеством пищевой продукции.

Совершенствование действующих и (или) создание новых методов анализа основных физико-химических, микробиологических

показателей и органолептических свойств для различных видов пищевой продукции является одним из ключевых пунктов в направлении реализации задач в области повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации [1].

Обеспечение микробиологической безопасности пищевых продуктов является одной из главных задач, решение которой непосредственно направлено на охрану здоровья населения. Во всем мире эта проблема приобретает особую актуальность в связи с увеличением числа заболеваний, передающихся через пищевые продукты, в особенности кишечных инфекций и бактериальных отравлений.

Для корреспонденции:

Шепелин Анатолий Прокопьевич, доктор биологических наук, заместитель директора по научно-производственной работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

Адрес: Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-0020

E-mail: shepelin@obolensk.org

Статья поступила 10.05.2017 г., принята к печати 30.06.2017 г.

For correspondence:

Anatoly P. Shepelin, Sc.D. (Bio.), Deputy Director for science and production, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0020

E-mail: shepelin@obolensk.org

The article was received 10.05.2017, accepted for publication 30.06.2017

Нормы и правила по гигиене пищевых продуктов были приняты комиссией Кодекс Алиментариус и переданы всем государствам – членам ФАО и ВОЗ в качестве рекомендательного документа, внедрение которого остается на усмотрение государств. Комиссия выразила мнение, что Нормы и правила могут предоставить полезный список требований для государственных учреждений, занимающихся контролем качества пищевых продуктов.

В настоящее время вся пищевая цепь, начиная от первичного производства и заканчивая конечным потреблением, определяет необходимые условия гигиены для производства безопасных и пригодных к потреблению пищевых продуктов [2].

Гигиенические нормативы по микробиологическим показателям безопасности пищевых продуктов включают следующие группы микроорганизмов:

- санитарно-показательные, к которым относятся: мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (МАФАНМ), бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформы), бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, энтерококки;
- условно-патогенные микроорганизмы, к которым относятся: *E. coli*, *S. aureus*, бактерии рода *Proteus*, *B. cereus* и сульфитредуцирующие кластридии, *Vibrio parahaemolyticus*;
- патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы и *Listeria monocytogenes*;
- бактерии рода *Yersinia* и другие патогенные микроорганизмы в соответствии с эпидситуацией в регионе производства;
- микроорганизмы порчи – дрожжи и плесневые грибы, молочнокислые микроорганизмы;
- микроорганизмы заквасочной микрофлоры и пробиотические микроорганизмы (молочнокислые микроорганизмы, пропионовокислые микроорганизмы, дрожжи, бифидобактерии, лактобациллы и др.) в продуктах с нормируемым уровнем технологической микрофлоры и в пробиотических продуктах.

Критериями безопасности консервированных пищевых продуктов (промышленная стерильность) является отсутствие в консервированном продукте микроорганизмов, способных развиваться при температуре хранения, установленной для конкретного вида консервов, и микроорганизмов и микробных токсинов, опасных для здоровья человека [3].

В Российской Федерации и странах Таможенного союза микробиологические показатели пищевых продуктов не должны превышать нормативов, установленных техническими регламентами Таможенного союза (ТР ТС) «О безопасности пищевой продукции» и другими техническими регламентами Таможенного союза, действие которых распространяется на пищевые продукты [4–8].

Микробиологические исследования пищевых продуктов проводят в соответствии с ТР ТС, ГОСТами, СанПиНами, методическими указаниями и другими нормативными документами.

Пристальное внимание исследователей к данной проблеме привлекает тенденция к расширению спектра пищевых инфекций и появлению новых возбудителей.

Обширная группа условно-патогенных и патогенных бактерий включает значительное количество микроорганизмов, которые могут рассматриваться как эмерджентные пищевые патогены (от английского emergent), что означает «внезапно появляющиеся», «вновь возникающие» инфекции.

Наиболее значимыми в эпидемиологическом отношении в настоящее время являются возбудители новых или так называемых «эмерджентных» бактериальных инфекций (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, энтерогеморрагические *E.coli* (EHEC), *Campylobacter jejuni*, *Enterobacter sakazakii* и др.). Термины «эмерджентные пищевые патогены» и «эмерджентные пищевые инфекции» в последнее время широко используются в научных публикациях и официальных документах международного сообщества и ВОЗ [9].

1. Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ)

Показатель КМАФАнМ характеризует качество, свежесть и безопасность продуктов питания, а также позволяет оценивать уровень санитарно-гигиенических режимов на производстве, условий хранения и транспортировки продукта.

Данный показатель применяется повсеместно для оценки качества продуктов, за исключением тех, в производстве которых используются специальные микробные культуры (например, пиво, квас, кисломолочные продукты и т.п.). В составе КМАФАнМ представлены различные таксономические группы микроорганизмов – бактерии, дрожжи, плесневые грибы. Их общая численность свидетельствует о санитарно-гигиеническом состоянии продукта, степени его обсемененности микрофлорой.

Продукты, содержащие большое количество бактерий, даже непатогенных и не изменяющих их органолептические показатели, нельзя считать полноценными. Значительное содержание жизнеспособных бактериальных клеток в пищевых продуктах (за исключением тех, при производстве которых применяют закваски) свидетельствует либо о недостаточно эффективной термической обработке сырья, либо о плохой мойке оборудования, либо о неудовлетворительных условиях хранения продукта. Повышенная бактериальная обсемененность продукта свидетельствует также о его возможной порче.

Микробиологические нормативы безопасности в ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» [4] предусматривают допустимые уровни показателя КМАФАнМ различных видов пищевых продуктов, например, в парном мясе показатель КМАФАнМ КОЕ/г (см³) должен быть не более 10, в рыбной продукции горячего и холодного копчения – не более 1×10^4 , в хлебобулочных изделиях – не более 1×10^3 и т.д.

КМАФАнМ – это число бактерий, способных образовывать колонии на поверхности и/или в питательном агаре при температуре 20–37°C в течение 24–48 ч, видимые с увеличением в 2 раза [10].

Определение КМАФАнМ в 1 г (1 см³) продукта (общее микробное число – ОМЧ) [10–12] предполагает использование метода посева в агаризованные питательные среды. Метод предназначен для пищевых продуктов, содержащих в 1 г твердого продукта более 150 или в 1 см³ жидкого продукта более 15 КОЕ мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФАнМ). Для этого используют чашечный агаровый глубинный метод, когда 1 см³ продукта в разведении вносят в чашку Петри и заливают расплавленным и остуженным до (45 ± 1°) С питательным агаром (рис. 1, 2). Если ожидают ползучий рост микроорга-



Рис. 1. Рост тест-штамма *Bacillus cereus* NCTC 8035 (ATCC 10702). Посев глубинным методом на среду КМАФАНМ производства ФБУН ГНЦ ПМБ.

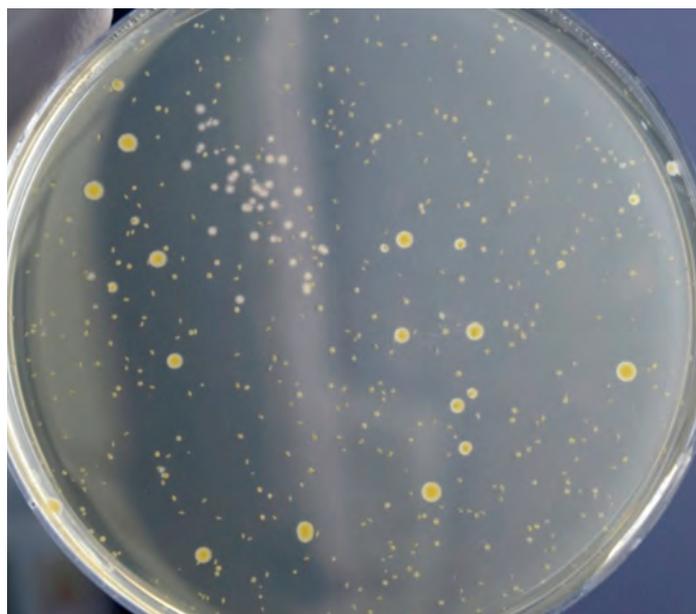


Рис. 2. Рост тест-штамма *S. aureus* ATCC 6538-P. Посев глубинным методом на среду КМАФАНМ производства ФБУН ГНЦ ПМБ.

низмов *Bacillus* или *Proteus*, то посеvy после застывания среды заливают вторым слоем питательной среды или голодного агара. После застывания чашки переворачивают и помещают в термостат для инкубации [13].

Питательные среды производства ФБУН ГНЦ ПМБ широко используются бактериологическими лабораториями не только в клинической, но и санитарной микробиологии. Многолетний опыт производства питательных сред в ФБУН ГНЦ ПМБ позволяет разрабатывать и сертифицировать новые питательные среды с целью внедрения их в практику производства, а следовательно, расширения номенклатуры сухих питательных сред для контроля пищевых продуктов.

Питательная среда производства ФБУН ГНЦ ПМБ для определения КМАФАНМ широко используется бактериологическими лабораториями в санитарной микробиологии. Она обеспечивает при посеве по 0,1 мл микробной взвеси через (21 ± 3) ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ на всех засеянных чашках Петри рост тест-штамма *B. cereus* NCTC 8035 (ATCC 10702) из разведения 10^{-5} , а также рост тест-штаммов *S. aureus* ATCC 6538-P и *E. cloacae* ГИСК А-186 из разведения 10^{-6} .

2. Определение количества бактерий группы кишечных палочек

Для приведения в соответствие показателя «бактерии группы кишечных палочек» (БГКП) с принятой международной номенклатурой (Coliformes – FAO/ВОЗ и СЭВ) к бактериям группы кишечных палочек отнесены граммотрицательные, не образующие спор палочки, сбраживающие лактозу с образованием кислоты и газа при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$. При необходимости производится дальнейшее исследование с идентификацией до *E. coli*. В тех случаях, когда на продукт имеется норматив – отсутствие БГКП в определенной массе продукта (альтернативный показатель), то результат записывается в соответствии с количеством продукта, подвергнутого микробиологическому анализу. Например, «бактерии груп-

пы кишечных палочек в 1 г – отсутствуют». В тех случаях, когда продукт должен содержать сравнительно низкие количества БГКП – не выше 10 (например, диетические молочные продукты – творог, сметана детская диетическая и т.д.), определение БГКП проводят методом наиболее вероятного числа (НВЧ). В тех случаях, когда на продукт имеется действующий ГОСТ, предусматривающий норматив по коли-титру, или необходимо выявить значительную степень загрязнения продукта БГКП, определяют их коли-титр [14].

В Российской Федерации и странах Таможенного союза содержание БГКП также ограничено ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» [4], ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции» [7] и другими техническими регламентами.

Так, например, бактерии группы кишечных палочек (колиформы), не допускаются в 1,0 г парного мяса (всех видов животных) и колбасных изделий; в 0,1 г макаронных изделий быстрого приготовления; в 0,01 г круп, не требующих варки, и т.д.

Для обнаружения и определения количества presumptивных бактерий *E. coli* и последующего расчета НВЧ используется ЕС-бульон, в котором посеvy инкубируются при температуре 44°C .

Presumptивная *E. coli* (presumptive *E. coli*) – бактерия, ферментирующая при температуре 44°C лактозу с образованием газа и образующая индол из триптофана. Если в ЕС-бульоне обнаружилось газообразование и, параллельно, образование индола в пептонной воде при температуре 44°C , результат расценивается как «содержащие presumptивную *E. coli*» в граммах или см³.

Питательная среда для селективного определения колиформных бактерий и *E. coli* (ЕС-бульон) предназначена для санитарно-бактериологических исследований воды, пищевых продуктов и других материалов с целью селективного определения колиформных бактерий при температуре инкубирования $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, а также *E. coli* и термотолерантных колиформных бактерий при температуре инкубирования $(44 \pm 0,5)^\circ\text{C}$.

Согласно соответствующим документам [15, 16], исследуемый материал после культивирования в жидкой селективной обогатительной среде при обнаружении затемнения, образования хлопьев или вспенивания среды высевают в ЕС-бульон. После инкубирования при различных температурах культивирования (37 ± 1)°C и ($44 \pm 0,5$)°C проводят визуальный учет результатов, учитывая наличие роста по диффузному помутнению среды и газообразованию.

ЕС-бульон производства ФБУН ГНЦ ПМБ обеспечивает во всех засеянных пробирках при посеве в 9 мл среды по 1,0 мл микробной взвеси из разведения 10^{-7} через 24–48 ч инкубации при температуре (37 ± 1)°C визуально обнаруживаемый рост в виде диффузного помутнения и газообразования каждого из тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 675, *K. pneumoniae* 418 и рост в виде диффузного помутнения и газообразования через 24–48 ч инкубации при температуре ($44 \pm 0,5$)°C каждого из тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 675.

ЕС-бульон полностью подавляет во всех засеянных пробирках рост тест-штамма *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 (NCTC 775) и *Bacillus cereus* NCTC 8035 при посеве в 9,0 мл среды по 1,0 мл микробной взвеси из разведения 10^{-4} через 24–48 ч инкубации при температуре (37 ± 1)°C.

Совокупность компонентов, входящих в состав ЕС-бульона, обеспечивает питательные потребности для накопления колIFORMных бактерий и *E. coli*. Соли желчных кислот подавляют рост грамположительных микроорганизмов. Фосфатный буфер поддерживает требуемый pH питательной среды.

3. Выявление бактерий рода *Salmonella*

Нормирование микробиологических показателей безопасности пищевых продуктов осуществляется для большинства групп микроорганизмов по альтернативному принципу, т.е. нормируется масса продукта, в которой не допускается патогенных микроорганизмов, в т.ч. сальмонелл. По требованиям различных нормативных документов, в том числе и СанПиН 2.3.2.1078-01 [17], сальмонеллы не допускаются в 25 г колбасных изделий, готовых мясных и других изделий из мяса. Сухие молочные смеси моментального приготовления имеют более жесткие требования по микробиологическим показателям в отношении сальмонелл. Масса, в которой не допускаются патогенные микроорганизмы, в т.ч. сальмонеллы – 100 г [3].

Бактерии рода *Salmonella* могут присутствовать в продукте в небольшом количестве вместе с большим количеством других бактерий из семейства *Enterobacteriaceae* или других семейств. Поэтому предварительное обогащение необходимо для выявления небольшого числа бактерий рода *Salmonella* или сублетально поврежденных бактерий рода *Salmonella*.

Навеску массой 25 г вносят в забуференную пептонную воду, затем инкубируют при температуре (37 ± 1)°C в течение (18 ± 2) ч. Для большего эффекта перед внесением навески продукта забуференную пептонную воду нагревают до температуры (37 ± 1)°C [18].

Забуференная пептонная вода соответствует рекомендациям ИСО (1993) и DIN Norms 10181 и 10160 по анализу молока и мяса, мясных продуктов соответственно. Забуференная пептонная вода для неселективного накопления бактерий предназначена для санитарно-бактериологических

исследований с целью неселективного накопления бактерий и репарации сублетально угнетенных клеток, в частности патогенных энтеробактерий.

Эта среда используется в качестве неселективного разбавителя, куда вносят исследуемый материал, согласно соответствующим документам [18, 19], и учитывают результаты, определяя наличие роста с последующим высевом на дифференциально-диагностические среды для выделения чистой культуры и дальнейшей ее идентификации.

Забуференная пептонная вода производства ФБУН ГНЦ ПМБ обеспечивает во всех засеянных пробирках при посеве в 9 мл среды по 1,0 мл микробной взвеси из разведения 10^{-7} через (18 ± 2) ч инкубации при температуре (37 ± 1)°C визуально обнаруживаемый рост каждого тест-штамма *E. coli* ATCC 25922, *S. enteritidis* 11272 и *S. typhimurium* 79 в виде диффузного помутнения среды.

ГОСТ 31659–2012 (ISO 6579:2002) «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*» рекомендует использование в качестве одной из сред селективного обогащения сальмонелл селенитовую среду [18].

Питательная среда для накопления сальмонелл (Селенитовый бульон) производства ФБУН ГНЦ ПМБ предназначена для санитарно-бактериологических исследований пищевых продуктов, объектов окружающей среды и других материалов с целью селективного накопления сальмонелл и последующим высевом на дифференциально-диагностические среды.

Совокупность компонентов, входящих в состав среды, обеспечивает питательные потребности для накопления сальмонелл. Бактерии восстанавливают гидроселенит натрия, образуя щелочь. Повышение pH уменьшает токсичность гидроселенита натрия, что способствует росту сопутствующей микрофлоры. Ферментация лактозы лактозоположительными микроорганизмами приводит к образованию кислоты, которая снижает pH, тем самым обеспечивая селективные свойства среды. Фосфатный буфер поддерживает требуемый pH и дополнительно стабилизирует токсичность гидроселенита натрия.

Исследуемый материал вносят в Селенитовый бульон согласно соответствующим документам [18, 20] и инкубируют 6 ч при температуре (37 ± 1)°C с последующим высевом на дифференциально-диагностические питательные среды, такие как агар Эндо (рис. 3 и 4), XLD-агар и др.

Показатель эффективности – не менее 10 (отношение среднего числа колоний *S. enteritidis* 11272 и *S. typhimurium* 79, выросших на чашках с агаром Эндо-ГРМ, либо на среде аналогичного назначения, после обогащения в течение 6 ч в Селенитовом бульоне, к среднему числу колоний, выросших до обогащения).

Показатель ингибиции – не менее 3 (отношение среднего числа колоний *E. coli* ATCC 25922, выросших на чашках с агаром Эндо-ГРМ, либо на среде аналогичного назначения, до обогащения в Селенитовом бульоне, к среднему числу колоний, выросших после обогащения в течение 6 ч).

4. Выявление *Listeria monocytogenes*

В продуктах массового потребления, для которых отсутствуют микробиологические нормативы, патогенные микроорганизмы, в т.ч. *Listeria monocytogenes*, не допускаются в 25 г продукта.

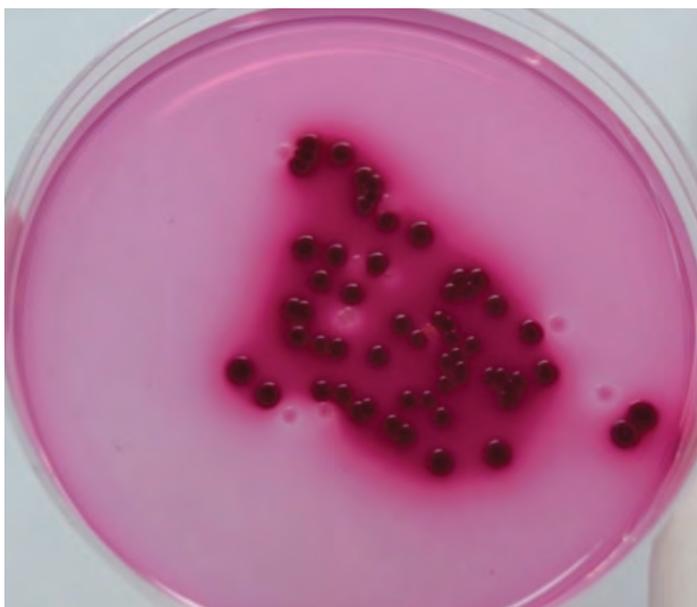


Рис. 3. Рост тест-штаммов *S. enteritidis* 11272 (бесцветные колонии) и *E. coli* ATCC 25922 (малинового цвета колонии) на агаре Эндо-ГРМ до обогащения в Селенитовом бульоне.

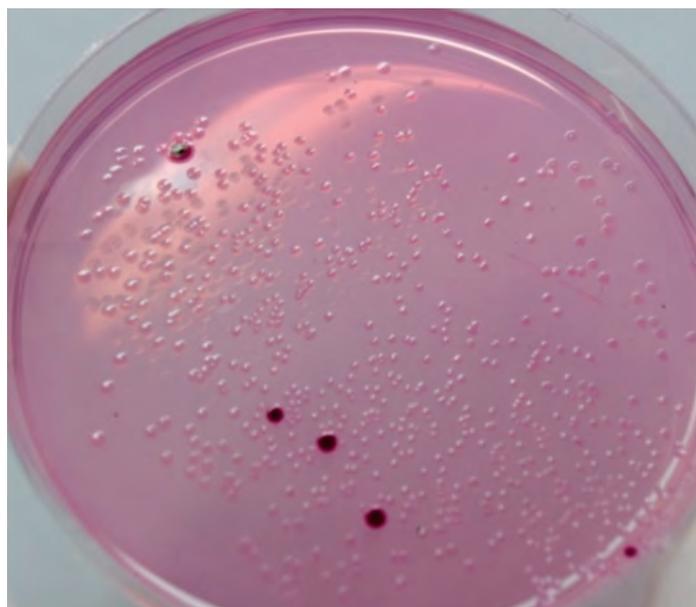


Рис. 4. Рост тест-штаммов *S. enteritidis* 11272 (бесцветные колонии) и *E. coli* ATCC 25922 (малинового цвета колонии) на агаре Эндо-ГРМ после инкубации в течение 6 ч в Селенитовом бульоне.

Анализ сырья, полуфабрикатов, готовой продукции на присутствие *Listeria monocytogenes* с применением сред обогащения, в том числе и Бульона UVM проводят согласно соответствующим нормативным документам [16, 21, 22].

Селективный бульон для обогащения листерий сухой (Бульон UVM) [16] применяется для санитарно-бактериологических исследований пищевых продуктов, объектов внешней среды и других объектов с целью селективного обогащения листерий.

Подготовленную для исследования навеску исследуемого продукта вносят в среду для первичного обогащения. Для посева берут 25 г (см³) продукта или 50–100 г (см³) продукта. Соотношение между инокулятом и питательной средой при посеве должно составлять 1 : 9 по объему. Посевы термостатируют при температуре 30°C. Для проведения вторичного обогащения 0,1 см³ культуры, полученной в результате первичного обогащения, пересевает в 10 см³ бульона. Посевы термостатируют при температуре (37 ± 1)°C в течение (48 ± 2) ч. Двухэтапный накопительный метод используется при анализе образцов, сильно загрязненных сопутствующей микрофлорой.

Бульон UVM-I используется в качестве селективной среды первичного обогащения. Селективные свойства UVM-I обеспечиваются наличием в среде налидиксовой кислоты и акрифлавина. Бульон UVM-II используется в качестве селективной среды вторичного обогащения. Селективная добавка к UVM-II дополнительно содержит акрифлавин.

После накопления листерий в Бульонах UVM производят высев на селективный агар (ПАЛ, ПАЛКАМ агар и др.).

Высокое содержание питательных веществ и большая буферная емкость Бульона UVM производства ФБУН ГНЦ ПМБ создают оптимальные условия для роста листерий. Ингибиторы подавляют рост сопутствующей микрофлоры при селективном культивировании *Listeria*.

Бульон UVM обеспечивает во всех засеянных пробирках рост тест-штаммов *L. monocytogenes* 766 и *L. ivanovii* при посеве по 0,1 мл микробной взвеси в 10 мл среды из разведе-

дения 10⁻⁶ не позднее 48 ч инкубации при температуре (30 ± 1)°C в виде помутнения среды.

Ингибирующие свойства. Бульон UVM должен полностью подавлять во всех засеянных пробирках рост тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922, *B. cereus* NCTC 8035 и *S. aureus* ATCC 6538-P при посеве по 0,1 мл микробной взвеси в 10 мл среды из разведения 10⁻⁴ через 48 ч инкубации при температуре (30 ± 1)°C.

После обогащения (первичного или вторичного) листерий с селективных бульонов, независимо от наличия признаков роста, производят пересев по 0,1 см³ культуральной жидкости на поверхность дифференциально-диагностической среды – ПАЛКАМ-агар. Посев по поверхности питательной среды производят стерильным шпателем либо бактериологической петлей методом истощающего штриха [16, 21, 22]. Посевы термостатируют при (37 ± 1)°C в течение (24–48) ч. При обнаружении характерных колоний, подозрительных на листерию, проводят их дальнейшую идентификацию.

«Питательная среда для селективного выделения и идентификации листерий сухая (ПАЛКАМ-агар)» производства ФБУН ГНЦ ПМБ предназначена для санитарно-бактериологических исследований пищевых продуктов и других объектов с целью селективного выделения и идентификации видов *Listeria*.

Выделение листерий основано на их способности гидролизовать эскулин с образованием эскулетина, который в присутствии ионов железа образует серо-зеленый комплекс с почернением среды вокруг колоний (рис. 5, 6). Высокая селективность среды достигается за счет включения в состав полимиксина, акрифлавина, цефтазидима и хлорида лития.

ПАЛКАМ-агар с СД обеспечивает на всех засеянных чашках Петри при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10⁻⁶ не позднее 48 ч инкубации при температуре (37 ± 1)°C рост тест-штаммов *L. monocytogenes* 766 и *L. ivanovii* в виде круглых колоний, серо-зеленого цвета, с образованием вокруг колоний черной зоны, *L. monocytogenes* 766 диаметром 1,4–1,8 мм, *L. ivanovii* – 1,2–1,4 мм.

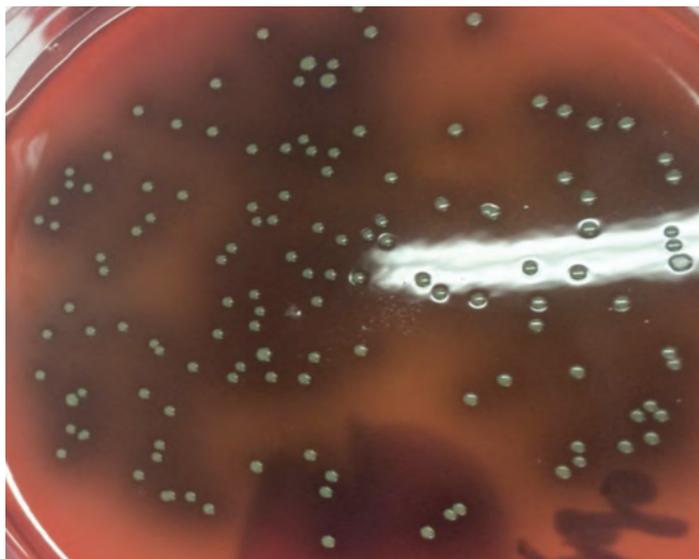


Рис. 5. Рост тест-штамма *L. monocytogenes* 766.

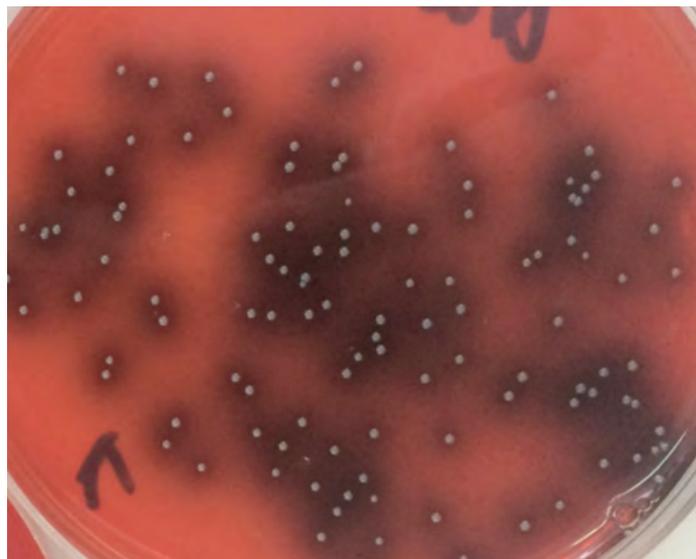


Рис. 6. Рост тест-штамма *L. Ivanovii*.

Среда подавляет рост тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 19433 (NCTC 775) и *S. aureus* ATCC 6538-P на всех засеянных чашках Петри при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10^{-4} через 48 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

5. Выявление и определение сульфитредуцирующих клостридий

Проникновение клостридий практически в любой пищевой продукт не представляет больших трудностей. Сложнее сохраниться в пищевом продукте в процессе его кулинарной обработки и приготовления с использованием высоких температур. Как только возникают неблагоприятные, опасные для возбудителя условия, он незамедлительно превращается в спорообразное состояние, а споры очень устойчивы и легко сохраняются в толще продукта и под вакуумной упаковкой. В процессе неправильного хранения продукта, особенно при комнатной температуре, дремлющие до поры споры активизируются и переходят в вегетативную форму, способную размножиться, выделяя при этом мощный токсин (яд), устойчивый к действию высоких температур. Размножению клостридий также способствует отсутствие свободного кислорода в толще пищевого продукта, и особенно в вакуумной упаковке. Действующими в нашей стране нормативными документами предусматривается контроль на наличие сульфитредуцирующих клостридий мясной и рыбной продукции, упакованной под вакуумом, сырокопченые колбасные изделия, изделия из мяса и рыбы, готовые к употреблению в потребительской таре (в т.ч. рыба сушеная), кулинарные изделия с термической обработкой, в том числе замороженные и т.д.

Методы выявления и определения количества сульфитредуцирующих бактерий основаны на высеве определенного количества продукта и (или) его разведений в питательные среды, культивировании посевов в оптимальных для роста условиях и, при необходимости, подсчета их количества и определения морфологических и биохимических свойств для подтверждения принадлежности сульфитредуцирующих бактерий к роду *Clostridium*. Метод посева в плотные пита-

тельные среды предназначен для пищевых продуктов, содержащих в 1 г твердого продукта не менее 150 или в 1 см³ жидкого продукта не менее 15 колониеобразующих единиц (КОЕ) сульфитредуцирующих бактерий [23].

Для выявления присутствия (отсутствия) сульфитредуцирующих клостридий в определенном количестве продукта или его эквивалентное разведение вносят в одну из вязких питательных сред: железосульфитная среда, дифференциальная улучшенная клостридиальная среда, вязкая среда Вильсон-Блера. При этом соотношение между количеством посевного материала и питательной средой должно составлять 1 : 9. Посевы культивируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ не более 72 ч [13].

При определении сульфитредуцирующей способности микроорганизмов также используют глубокий способ культивирования в чашках Петри. При отсутствии анаэробстата на поверхность затвердевшей среды в чашки или пробирки наливают слой не менее 0,2 см голодного агара [24].

Если необходимо, для обеспечения гибели вегетативных форм или неспорообразующих форм бактерий применяют тепловую обработку исходной суспензии или жидкого продукта. Температура и время тепловой обработки варьируют от умеренного теплового пастеризационного эффекта (например, 75°C в течение 20 мин) до кипения в течение нескольких минут. В этом случае результат подсчета выражают как число спор сульфитредуцирующих бактерий, растущих в анаэробных условиях [23].

Железосульфитный агар предназначен для бактериологических исследований в санитарной и клинической микробиологии с целью выявления сульфитредуцирующих клостридий в пищевых продуктах, воде, почве; при микробиологической диагностике дисбактериоза кишечника, для научных исследований.

Железосульфитный агар производства ФБУН ГНЦ ПМБ выпускается в трех модификациях. При использовании среды в модификациях 1 и 2 исследуемый материал засевают в середину столбика среды, аккуратно перемешивая, и инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. При использовании среды в модификации 3 исследуемый материал засевают на

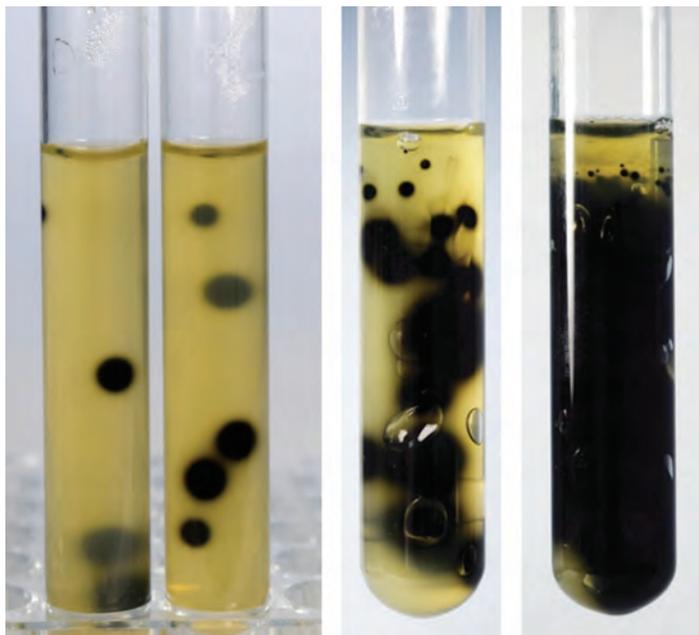


Рис. 7. Рост тест-штамма *C. perfringens* 13124 в железосульфитном агаре (модификация 1, 2).

чашки Петри и инкубируют при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в анаэробных условиях.

Железосульфитный агар (модификация 1, 2) (рис. 7).

Рост тест-штамма *C. perfringens* 13124 при посеве из разведения 10^{-5} сопровождается образованием колоний черного цвета через 24 ч культивирования при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Модификация 3:

Тест-штамм *C. perfringens* 13124 образует колонии R-формы черного цвета или белого цвета с черным центром и частичным почернением среды через 24 ч культивирования в анаэробных условиях при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ (рис. 8).

Совокупность компонентов, входящих в состав питательной среды, обеспечивает питательные потребности для роста клостридий и их идентификации по сульфитредуцирующему признаку: способности редуцировать сульфит до сульфида, который с ионами железа образует черный преципитат.

6. Определение коагулазоположительных стафилококков

Среди микроорганизмов, вызывающих пищевые токсикозы, стафилококки занимают одно из первых мест. Заболевания возникают в результате употребления, прежде всего, молока и молочных продуктов, а также различных мясных изделий, содержащих токсины. Профилактика пищевых интоксикаций стафилококковой этиологии сводится к предотвращению обсеменения продуктов патогенными стафилококками, размножению их, а также к уничтожению возбудителя в продуктах питания. Необходимо строго соблюдать технологические режимы тепловой обработки продуктов и сроки хранения скоропортящейся продукции. Например, не допускается наличие стафилококков в 1,0 г колбасных изделий и продуктах из мяса, в 0,1 г мясных блюдах, готовых, быстрозамороженных, а также паштетах из печени и (или) мяса и т.д. [3]. Особое внимание уделяется микробиологическому контролю детских смесей на наличие стафилококков. Микробиологические показатели на продукты детского питания разработа-

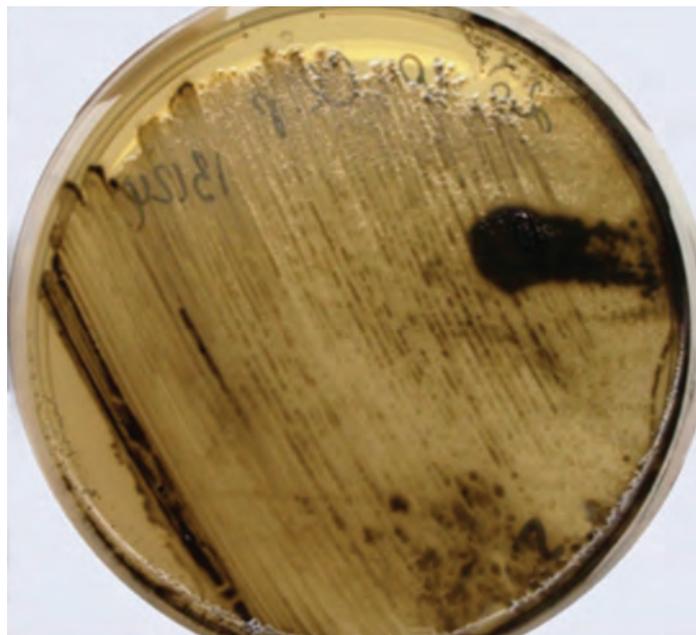


Рис. 8. Рост тест-штамма *C. perfringens* 13124 на железосульфитном агаре (модификация 3).

ны, с одной стороны, с учетом возрастных особенностей детей, для питания которых предназначаются эти продукты, с другой – с учетом степени термической обработки разведенного сухого продукта перед употреблением. Так, *S. aureus* должен отсутствовать в 10,0 г продукта без предварительной термической обработки продукта перед употреблением и в 1,0 г – после термической обработки (80–100°C) [25].

Метод определения коагулазоположительных стафилококков основан на способности микроорганизмов из рода *Staphylococcus* расти на питательных средах с повышенным содержанием поваренной соли. Для первичного выделения стафилококков из исследуемого материала наиболее информативными и оптимальными являются дифференциально-диагностические среды: элективно-солевой агар, стафилококкагар и питательная среда №10 ГРМ, в которых элективность достигается высокой концентрацией хлористого натрия. Наибольшее санитарно-гигиеническое значение имеет *S. aureus* (золотистый стафилококк).

В последнее время все более широкое применение в практике врачей-бактериологов находят две среды – для селективного обнаружения патогенных маннитположительных стафилококков (агар Фогель–Джонсона) и для выделения и учета коагулазоположительных стафилококков (агар Байрд–Паркера). Обе среды содержат хлорид лития и теллурид калия для подавления роста сопутствующей микрофлоры. Наличие теллурита калия вызывает почернение колоний стафилококков [26].

Агар Байрд–Паркера производства ФБУН ГНЦ ПМБ предназначен для выделения и учета количества коагулазоположительных стафилококков в пищевых продуктах, фармацевтических и косметических продуктах, экологических пробах и др.

Агар Байрд–Паркера обеспечивает при посеве по 0,1 мл микробной взвеси каждого тест-штамма через (48 ± 3) ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ рост *S. aureus* «Виотко», *S. aureus* ATCC 6538-P, *S. aureus* Wood-46 из разведения



Рис. 9. Рост тест-штамма *S. aureus* «Виотко».

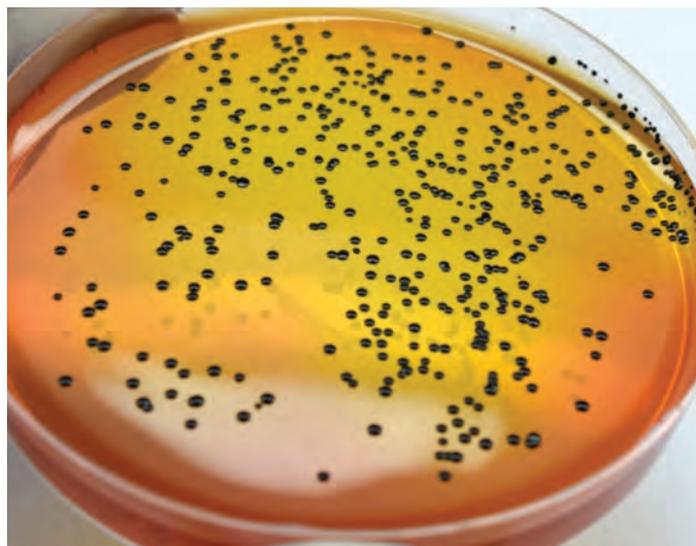


Рис. 10. Рост тест-штамма *S. aureus* ATCC 6538-P.

10^{-6} ; *S. epidermidis* ATCC 14990, *S. saprophyticus* CCM 883 из разведения 10^{-5} в виде:

- колонии *S. aureus* «Виотко» (рис. 9), *S. aureus* ATCC 6538-P, *S. aureus* Wood-46 – черного цвета с зоной липолиза и протеолиза, диаметром от 1,0 до 2,0 мм;

- колонии *S. epidermidis* ATCC 14990, *S. saprophyticus* CCM 883 – точечные колонии черного цвета.

Агар Байрд–Паркера подавляет рост и роение тест-штамма *Proteus mirabilis* 3177 из разведения 10^{-5} на всех засеянных чашках при посеве по 0,1 мл микробной взвеси через 48 ± 3 ч инкубации при температуре (37 ± 1)°C.

Питательный агар Фогель–Джонсона (производства ФБУН ГНЦ ПМБ) предназначен для выявления маннитположительных стафилококков из различных объектов при проведении бактериологического исследования. Агар Фогель–Джонсона обеспечивает визуально обнаруживаемый рост *S. aureus* «Виотко», *S. aureus* ATCC 6538-P, *S. aureus* Wood-46, *S. epidermidis* ATCC 14990, *S. saprophyticus* CCM 883 при посеве по 0,1 мл микробной взвеси каждого тест-штамма из разведения 10^{-5} через 48 ч инкубации при температуре (37 ± 1)°C:

- колонии *S. aureus* «Виотко», *S. aureus* ATCC 6538-P (рис. 10), *S. aureus* Wood-46, *S. saprophyticus* CCM 883 – черного цвета с желтой зоной, диаметром от 0,5 до 2,0 мм;

- колонии *S. epidermidis* ATCC 14990 – черного цвета, диаметром от 0,5 до 1,0 мм.

Агар Фогель–Джонсона подавляет рост тест-штамма *P. mirabilis* 3177 из разведения 10^{-4} на всех засеянных чашках при посеве по 0,1 мл микробной взвеси через 48 ч инкубации при температуре (37 ± 1)°C.

В настоящее время на предприятиях пищевой промышленности постоянно совершенствуются и создаются новые технологии, расширяется ассортимент выпускаемой продукции, которая должна оставаться качественной в процессе длительного хранения и быть безопасной для потребителя. ФБУН ГНЦ ПМБ, являющийся одним из основных производителей питательных сред в Российской Федерации, непрерывно расширяет номенклатуру современных питательных сред, необходимых для обеспечения бактериологических лабораторий предприятий пищевой отрасли.

Литература

1. Правительство Российской Федерации. Распоряжение N 1364-р от 29 июня 2016 года «Об утверждении Стратегии повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года».
2. Кодекс Алиментариус. Общие принципы гигиены пищевых продуктов. М.: «Весь мир», 2006, с. 7-8.
3. Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к продукции (товарам), подлежащей санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) (с изменениями на 10 ноября 2015 года) Глава II Раздел 1. Требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов, с. 15-16
4. ТР ТС 021/2011. О безопасности пищевой продукции.
5. ТР ТС 023/2011. Технический регламент на соковую продукцию из фруктов и овощей.
6. ТР ТС 024/2011. Технический регламент на масложировую продукцию.
7. ТР ТС 033/2013. О безопасности молока и молочной продукции.
8. ТР ТС 034/2013. О безопасности мяса и мясной продукции.
9. Хаджибаева ИФ, Рокутова АВ, Омарова ДТ, Клипина НВ. *Enterobacter sakazakii* – новый возбудитель пищевой токсикоинфекции у детей (Обзор современной литературы). Медицина. 2013;4:27.
10. ГОСТ 10444.15-94. Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. М.: Стандартинформ, 2010, с. 7.
11. ГОСТ 26670-91. Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов. М.: Стандартинформ, 2008, с. 7.
12. ГОСТ Р 50396.1-2010. Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты из мяса птицы. Метод определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. М.: Стандартинформ, 2011, с. 6
13. Руководство по медицинской микробиологии. Книга 1. Общая и санитарная микробиология. Под редакцией А.С.Лабинской, Е.Г.Волиной. М.: БИНОМ, 2008, с. 929.
14. Методические указания по санитарно-бактериологическому контролю на предприятиях общественного питания и торговли пищевыми продуктами (№26571982 г).
15. ГОСТ 31708-2012 (ISO 7251:2005) Микробиология пищевых продуктов и кормов. Метод обнаружения и определения количества presumptивных бактерий *Escherichia coli*.
16. ГОСТ ISO 11133-2-2011. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству пита-

- тельных сред. Часть 2. Практические руководящие указания по эксплуатационным испытаниям питательных сред. М.: Стандартинформ, 2013.
17. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы «Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. СанПиН 2.3.2.1078-01 (с изменениями на 6 июля 2011 г)».
 18. ГОСТ 31659-2012. Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*.
 19. ГОСТ Р 54085-2010. Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Shigella*.
 20. МУ 4.2.2723-10 Лабораторная диагностика сальмонеллезов, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды.
 21. ГОСТ 32031-2012. Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*.
 22. МУК 4.2.1122-02. Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах.
 23. ГОСТ 29185-2014 (ISO 15213:2003). Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета сульфитредуцирующих бактерий, растущих в анаэробных условиях.
 24. ГОСТ 7702.2.6-2015. Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты из мяса птицы. Методы выявления и определения количества сульфитредуцирующих клостридий.
 25. МУК 4.2.577-96. Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов.
 26. Шепелин АП, Полосенко ОВ, Марчихина ИИ, Шолохова ЛП, Дятлов ИА. Питательные среды для выявления стафилококков в клинической и санитарной микробиологии. Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. 2015;4(56):39-43.
 27. Шепелин АП, Домотенко ЛВ, Дятлов ИА, Миронов АЮ, Алешкин ВА. Современные подходы к проблеме импортозамещения в области производства питательных сред. Клиническая лабораторная диагностика. 2015;60(6):63-5.
 13. *Rukovodstvo po meditsinskoj mikrobiologii [Medical Microbiology]*. In: *Obshchaya i sanitarnaya mikrobiologiya [General and Sanitary Microbiology]*. Ed by A.S.Labinskaya, E.G.Volina. Moscow: "BINOM" Publ., 2008, pp. 929. (In Russian).
 14. *Methodological guidelines for sanitary-bacteriological control at the enterprises of public catering and food trade (№ 26571982 г)*. (In Russian).
 15. *GOST 31708-2012 (ISO 7251:2005). Microbiology of food and. A method of detecting and quantifying bacteria presumptuous *Escherichia coli**. (In Russian).
 16. *GOST ISO 11133-2-2011. Microbiology of food and animal feed. Guidelines for the preparation and production of culture media. Part 2. Practical guidelines on performance testing of culture media*. Moscow: "Standartinform" Publ. (In Russian).
 17. *Sanitary-epidemiological norms "Hygienic requirements to safety and nutritional value of foods. SanPiN 2.3.2.1078-01 (as amended on July 6, 2011)"*. (In Russian).
 18. *GOST 31659-2012. Food. Method of detecting bacteria of the genus *Salmonella**. (In Russian).
 19. *GOST R 54085-2010. Food. Method of detecting bacteria of the genus *Shigella**. (In Russian).
 20. *MU 4.2.2723-10 Laboratory diagnosis of salmonellosis detection of *Salmonella* in food and environmental objects*. (In Russian).
 21. *GOST 32031-2012. Food. Methods of identifying bacteria *Listeria monocytogenes**. (In Russian).
 22. *MUK 4.2.1122-02. Organization of control and methods for detection of bacteria *Listeria monocytogenes* in food*. (In Russian).
 23. *GOST 29185-2014 (ISO 15213:2003). Microbiology of food and animal feed. Methods of identifying and counting sulfitereducing bacteria growing under anaerobic conditions*. (In Russian).
 24. *GOST 7702.2.6-2015. Methods to identify and quantify sulfitereducing *Clostridium**. (In Russian).
 25. *MUK 4.2.577-96. Methods of microbiological control of products for children, therapeutic feeding and their components*. (In Russian).
 26. *Shepelin AP, Polosenko OV, Marchikhina II, Sholokhova LP, Dyatlov IA. Culture media for detection of staphylococci in clinical and sanitary microbiology. Biopreparaty. Profilaktika. Diagnostika. Lechenie. 2015;4(56):39-43*. (In Russian).
 27. *Shepelin AP, Domotenko LV, Dyatlov IA, Mironov AYU, Aleshkin VA. The actual approaches to problem of import substitution in th field of production growth medium. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2015;60(6):63-5*. (In Russian).

References

1. The Government of The Russian Federation. Order N 1364-R dated June 29, 2016 "On approval of the Strategy of improving the quality of food products in the Russian Federation until 2030». (In Russian).
2. *Kodeks Alimentarius. Obshchie printsipy gigieny pishchevykh produktov*. Moscow: «Ves' mir» Publ., 2006, pp. 7-8. (In Russian).
3. *Uniform sanitary and epidemiological and hygienic requirements for products (goods) subject to sanitary-epidemiological supervision (control) (amended on 10 November 2015) Chapter II. Section 1. Safety requirements and nutritional value of foods*, pp. 15-16. (In Russian).
4. *TR TS 021/2011. On safety of food products*. (In Russian).
5. *TR TS 023/2011. Technical regulations for juice products from fruits and vegetables*. (In Russian).
6. *TR TS 024/2011. Technical regulations for oil and fat products*. (In Russian).
7. *TR TS 033/2013. On safety of milk and dairy products*. (In Russian).
8. *TR TS 034/2013. On safety of meat and meat products*. (In Russian).
9. *Khadzhibavaeva IF, Rokutova AV, Omarova DT, Klipina NV. *Enterobacter sakazaki* – new pathogen of nutritional toxicoinfection of children (review of modern literature)*. *Meditsina*. 2013;4:27. (In Russian).
10. *GOST 10444.15-94. Food. Methods for determination quantity of mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms*. Moscow: "Standartinform" Publ., 2010, pp. 7. (In Russian).
11. *GOST 26670-91. Food. Methods of cultivation of microorganisms*. Moscow: "Standartinform" Publ., 2008, pp. 7. (In Russian).
12. *GOST R 50396.1-2010. Method of determining quantity of mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms*. Moscow: "Standartinform" Publ., 2011, pp. 6 (In Russian).

Информация об авторах:

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

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Полосенко Ольга Вадимовна, кандидат биологических наук, заведующая сектором микробиологических исследований ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0017
E-mail: polosenko@obolensk.org

Information about authors:

Ivan A. Dyatlov, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med), Professor, Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Olga V. Polosenko, Ph.D., Chief of Microbiological Research Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: 142279 Obolensk, Serpukhov District, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0017
E-mail: polosenko@obolensk.org

Чувствительность и формирование устойчивости к антисептикам и дезинфектантам у возбудителей внутрибольничных инфекций

И.А.Дятлов, Е.В.Детушева, И.П.Мицевич, К.В.Детушев, Я.В.Подкопаев, Н.К.Фурсова

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

Работа посвящена изучению чувствительности клинически значимых микроорганизмов, выделенных в 2015–2016 гг. в отделениях реанимации и интенсивной терапии, а также при расследовании вспышек внутрибольничных инфекций, к препаратам антисептиков и дезинфектантов. Разработан методический подход для сравнительного анализа чувствительности микроорганизмов в планктонном состоянии и для биопленок. Показано, что биопленки современных клинических штаммов микроорганизмов значительно более устойчивы к антибактериальным препаратам по сравнению с планктонными клетками. Для клинических штаммов микроорганизмов характерна способность формировать устойчивость к антибактериальным препаратам в условиях селективного давления субингибирующих концентраций. На примере антисептиков разных функциональных классов – хлоргексидина и цетилпиридиния хлорида – изучена динамика формирования резистентных клонов к ним у актуальных госпитальных патогенов *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и *S. aureus*. Изучение проблемы возникновения устойчивости к антибактериальным препаратам у возбудителей инфекций человека является весьма актуальным и важным научным направлением, необходимым для совершенствования контроля внутрибольничных инфекций в Российской Федерации.

Ключевые слова: антисептики, дезинфектанты, бактериальная устойчивость, внутрибольничные инфекции, планктонные бактерии, биопленки

Для цитирования: Дятлов И.А., Детушева Е.В., Мицевич И.П., Детушев К.В., Подкопаев Я.В., Фурсова Н.К. Чувствительность и формирование устойчивости к антисептикам и дезинфектантам у возбудителей внутрибольничных инфекций. Бактериология. 2017; 2(2): 48–58. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-48-58

Sensitivity and formation of stability to antiseptics and disinfectants in hospital infections

I.A.Dyatlov, E.V.Detusheva, I.P.Mitsevich, K.V.Detushev, Ya.V.Podkopaev, N.K.Fursova

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

The work is devoted to the study of the sensitivity of clinically significant microorganisms, isolated in 2015–2016 in intensive care hospital units, as well as in the investigation of outbreaks of nosocomial infections, to antiseptics and disinfectants. A methodological approach has been developed for a comparative analysis of the sensitivity of microorganisms in the plankton state and for biofilms. It is shown that biofilms of modern clinical strains are much more resistant to antibacterial drugs, in comparison with plankton cells. The ability to form resistance to antibacterial drugs in conditions of selective pressure of subinhibitory concentrations is characteristic for clinical strains of microorganisms. The dynamics of the formation of resistant clones to antiseptics of different functional classes – chlorhexidine and cetylpyridinium chloride in the actual hospital pathogens *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *S. aureus* was studied. The problem of the emergence of resistance to antibacterial drugs in infectious agents of human infections is a very relevant and important scientific direction necessary to improve the control of nosocomial infections in the Russian Federation.

Keywords: antiseptics; disinfectants; bacterial resistance; intrahospital infections; planktonic bacteria; biofilms.

For citation: Dyatlov I.A., Detusheva E.V., Mitsevich I.P., Detushev K.V., Podkopaev Ya.V., Fursova N.K. Sensitivity and formation of stability to antiseptics and disinfectants in hospital infections. Bacteriology. 2017; 2(2): 48–58. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-48-58

Для корреспонденции:

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

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: fursova@obolensk.org

Статья поступила 10.05.2017 г., принята к печати 30.06.2017 г.

For correspondence:

Nadezhda K. Fursova, Cand. Sci. (Biol.), Head of Antimicrobial Agents Lab., Molecular Microbiology Dep., FBIS State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: fursova@obolensk.org

The article was received 10.05.2017, accepted for publication 30.06.2017

Одним из критериев качества оказания медицинской помощи является показатель заболеваемости внутрибольничными инфекциями (инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, ИСМП). ИСМП представляют серьезную проблему для общественного здравоохранения для всех стран, оказывают отрицательное влияние на показатели заболеваемости, смертности и степени тяжести состояния пациентов лечебных учреждений, стоимости и продолжительности лечения, а также представляют опасность для медицинских работников [1]. В России ИСМП ежегодно регистрируются у 35 тыс. пациентов, однако, согласно экспертным оценкам, реальная заболеваемость госпитальными инфекциями может составлять до 2,5 млн человек в год, что связано с несовершенством выявления и регистрации случаев ИСМП. Если тенденция нарастания числа внутрибольничных инфекций сохранится, то к 2050 г. данный показатель может возрасти до 10 млн человек в год [2]. Особую настороженность у клиницистов и руководителей здравоохранения вызывает тот факт, что в Российской Федерации 33,0% всех случаев ИСМП регистрируется в родовспомогательных учреждениях, в том числе 16,8% – в отделениях реанимации и интенсивной терапии новорожденных и недоношенных детей [3, 4]. В этиологической структуре ИСМП новорожденных наблюдается неуклонный рост доли стафилококков [5]. При этом изменяется соотношение клинической значимости антибиотикорезистентных и чувствительных стафилококков: возрастает число инфекций, вызванных коагулазонегативными стафилококками, доля которых составляет 30% от общего числа возбудителей [6, 7]. Кроме того, отмечается также нарастание роли грамотрицательных бактерий (*Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.*), доля которых в структуре ИСМП родовспомогательных учреждений составляет около 25% [8–11]. Отмечается также увеличение значимости инфекций, обусловленных дрожжеподобными грибами рода *Candida*, что ассоциировано с длительностью госпитализации [12].

Усугубляющим проблему ИСМП фактором является то, что более 90% всех внутрибольничных инфекций имеют бактериальное происхождение, возбудители которых отличаются множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), а также устойчивостью ко многим антисептикам и дезинфицирующим средствам [13]. Вторым усугубляющим фактором, по оценке Национального института здоровья США, является факт, что 80% всех бактериальных инфекций человека, в том числе ИСМП, связаны со способностью возбудителей формировать биопленки, в составе которых бактерии имеют значительно более высокую устойчивость к антимикробным препаратам, по сравнению с планктонными клетками [6]. Поэтому важное значение приобретают методы определения чувствительности патогенов к используемым препаратам антибиотиков, антисептиков и дезинфектантов, позволяющие оценить чувствительность патогенов в разных физиологических состояниях для обеспечения эффективности антибактериальных мероприятий [11, 14].

В настоящее время широко обсуждаются вопросы формирования резистентности госпитальных штаммов к антибиотикам. При этом, по мнению некоторых авторов, имеется корреляционная зависимость между устойчивостью возбу-

дителей данных штаммов к дезинфицирующим средствам и антибиотикам, что является одной из важных причин широкого распространения и циркуляции данных штаммов, ведущих к ухудшению эпидемиологической ситуации и росту заболеваемости ИСМП [9, 15]. Отсутствие микробиологического мониторинга приводит к поздней диагностике инфекций, неадекватной антимикробной терапии, недооценке эпидемиологической ситуации в отделении [16, 17]. По данным, представленным в «Национальной Концепции РФ по профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи», разработанной в 2011 г., наблюдаемые в последние годы в России случаи регистрации и внедрения в практику здравоохранения неэффективных антисептических и дезинфекционных средств связаны с нарушениями в экспертной оценке новых средств, и подчеркивается необходимость создания новых методов определения чувствительности госпитальных патогенов к антимикробным препаратам, в том числе антисептикам и дезинфектантам [18].

Данное исследование посвящено сравнительному изучению чувствительности к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам у возбудителей внутрибольничных инфекций в планктонном состоянии и в форме бактериальных биопленок с помощью оригинального разработанного авторами метода, а также выяснению молекулярно-генетических механизмов формирования устойчивости бактерий к антибактериальным препаратам, на примере устойчивости к триклозану у *Staphylococcus aureus*.

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов. В работе использованы штаммы микроорганизмов: референс-штаммы бактерий *Klebsiella pneumoniae* ($n = 2$), *Escherichia coli* ($n = 1$), *Staphylococcus aureus* ($n = 1$) и *Pseudomonas aeruginosa* ($n = 2$), *Streptococcus pyogenes* ($n = 1$), *Streptococcus agalactiae* ($n = 1$), *Haemophilus influenzae* ($n = 1$), *Moraxella catarrhalis* ($n = 1$), *Staphylococcus epidermidis* ($n = 1$), *Staphylococcus saprophyticus* ($n = 1$), *Candida albicans* ($n = 1$), *Proteus vulgaris* ($n = 1$) (получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск»); клинические штаммы *K. pneumoniae* ($n = 8$), *P. aeruginosa* ($n = 4$), *Acinetobacter baumannii* ($n = 4$) и *Proteus mirabilis* ($n = 3$) (выделены от пациентов отделения нейрореанимации г. Москвы в 2013 г.); клинические штаммы *Elizabethkingia meningoseptica* ($n = 1$), *A. baumannii* ($n = 4$), *S. aureus* ($n = 2$), *Staphylococcus warneri* ($n = 1$), *S. epidermidis* ($n = 1$), *Streptococcus haemolyticus* ($n = 2$), *Streptococcus hominis* ($n = 1$), *Stenotrophomonas maltophilia* ($n = 1$) (выделены от пациентов детской реанимации Орловской области в 2016 г.); *Streptococcus pyogenes* ($n = 1$), *M. catarrhalis* ($n = 1$), *S. aureus* ($n = 1$), *C. albicans* ($n = 1$), *P. aeruginosa* ($n = 2$), *K. pneumoniae* ($n = 1$), *P. mirabilis* ($n = 1$), *Micrococcus luteus* ($n = 1$), *Acinetobacter pittii* ($n = 1$) выделены из клинических образцов при расследовании случаев инфекций по заданию Роспотребнадзора в 2016–2017 гг.

Идентификация микроорганизмов. Для видовой идентификации микроорганизмов использовали API системы (bioMérieux, Франция), приборы Vitek 2 Compact (bioMérieux, Франция) и MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия).

Культивирование микроорганизмов. Для культивирования микроорганизмов использовали агар и бульон Мюллера-Хинтона (Himedia, Индия), агар и бульон ГРМ (Оболенск, Россия), и среду ГБМ (Оболенск, Россия) [19]. Культивирование планктонных форм микроорганизмов проводили в течение 20–24 ч при температуре 37°C. Культивирование биопленок микроорганизмов проводили в течение 168 ч при температуре 37°C.

Препараты биоцидов. В работе использовали препараты антисептиков «Триклозан» (Sigma-Aldrich Chemie, Германия), «Дезин» – 20%-ный хлоргексидин (ООО «Дезиндустрия», Россия), «Мирамистин» (ООО «Инфамед», Москва), «Бензалкония хлорид» (ООО «Химаналит», Россия), Цетилпиридиния хлорид (ООО «Химаналит», Россия) и дезинфектантов «Део-хлор» (ООО «Део», Россия), «Централь» (ООО «Бозон», Россия), «Тотус» (ООО «Авансепт Медикал», Россия), «Мистраль форте» (ООО «Авансепт Медикал», Россия), «Мистраль» (ООО «Авансепт Медикал», Россия), «Главкислород» (ООО «Авансепт Медикал», Россия), «Тори ОКСИ» ООО «Торимед», Россия), «БебиДез ультра» (ООО «Лизоформ-СПб», Россия).

Чувствительность планктонных культур к препаратам биоцидов планктонных культур (минимальные подавляющие концентрации, МПК и минимальные бактерицидные концентрации, МБК) определяли методом серийных разведений в бульоне, а также нанося микрокапли (10 мкл бактериальной суспензии в концентрации 10^7 – 10^8 КОЕ/мл) тестируемых культур на поверхность питательного агара, содержащего серийные разведения биоцида. За МПК принимали наименьшую концентрацию биоцида при которой отмечался бактериальный рост в бульоне или на агаре через 24 ч культивирования, а за МБК – через 72 ч культивирования [20].

Чувствительность бактериальных биопленок к препаратам антисептиков и дезинфектантов (МБК) определяли методом аппликаторов, нанося аппликатор с отпечатком бактериального газона, моделирующего состояние биопленки на поверхность питательного агара, содержащего серийные разведения биоцида, в ориентации «вниз бактериальным отпечатком». За МБК принимали минимальную концентрацию биоцида, на которой отсутствовал рост культуры [20].

Селекция культур, устойчивых к препаратам антисептиков. Селекцию устойчивых к антисептикам вариантов микроорганизмов осуществляли путем последовательных пересевов бактериальной культуры в питательном бульоне, содержащем ступенчато повышающиеся концентрации антисептика, в течение 2–8 нед, в зависимости от вида микроорганизма. Стабильность наследования приобретенной устойчивости к антибактериальному препарату у полученных вариантов определяли с помощью культивирования на питательной среде, не содержащей селективного агента, в течение 6–20 мес.

Определение параметров роста (бактериального фитнеса) штаммов осуществляли используя следующие показатели G_T (мин) – время одной генерации, K_D (мм/ч) – скорость линейного роста диаметра колоний, t_{1mm} , (ч) – времени достижения колониями диаметра 1 мм. Измерения проводили по «Упрощенной модели роста диаметра колоний одноклеточных микроорганизмов» [21] с помощью микроскопа ЛОМО МИКМЕД Д-2 (ЛОМО, ОАО СПб, Россия).

Выделение бактериальной ДНК осуществляли СТАВ-методом [22]. Количество полученной ДНК определяли спек-

трофотометрически на приборе UV-1700 (Zhimadzu, Япония) при длине волны 260 нм.

Полимеразная цепная реакция. Для амплификации фрагмента гена *fabI* *S. aureus* использовали специфичные олигонуклеотидные праймеры: *fabI* f 5'-ggcscacaacaagaacgt-3' и *fabI* R 5'-gttcaccaactgggtgac-3' [23]. Амплификацию проводили в термоциклере DNA Engine Dyad (Bio-Rad, США) при следующем режиме: начальная денатурация при 95°C – 4 мин, затем 25 циклов, включающих денатурацию при 95°C – 30 с, отжиг – 30 с и элонгацию при температуре 72°C – 80 с, в реакционной смеси, содержащей буфер для ПЦР с 15 мМ MgCl₂ (Termo Fisher Scientific, Европа), по 200 мкМ dATP, dCTP, dGTP и dUTP, 10 пмоль каждого праймера, 2,5 ед *Taq*-полимеразы и 10 нг ДНК. Наличие ПЦР-продукта детектировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле (Amersham Biosciences, Великобритания) с последующей визуализацией ДНК окраской 10% бромистым этидием. Очистку ПЦР-продуктов осуществляли с помощью набора реактивов «Dyenaic ETDye Terminator CycleS equencing» (Amersham Biosciences, Великобритания), согласно инструкции фирмы-изготовителя. Амплифицированный фрагмент гена секвенировали, используя протокол для автоматического секвенатора MegaBase 750 (Amersham Biosciences, Великобритания).

Полногеномное секвенирование осуществляли в системе Ion Torrent PGM (Life Technologies, США). Геномные библиотеки готовили с помощью набора реагентов Ion Plus Fragment Library Kit (Life Technologies, США). Секвенирование ДНК осуществляли с использованием генетического анализатора IonTorrentPGM, набора реагентов Ion PGM 400 Sequencing Kit и чипа для секвенирования Ion 318™ Chip Kit (Life Technologies, США).

Биоинформационный анализ секвенированных последовательностей ДНК осуществляли с помощью программ Vector NTI9 (Invitrogen, США), CHROMAS (Technelysium Pty Ltd, Австралия) и веб-ресурса BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Полученные в результате полногеномного секвенирования данные собирали с помощью ассемблера Newbler 2.9, биоинформационный анализ осуществляли с помощью программ Vector NTI10 (Invitrogen, США), Mauve (<http://darlinglab.org/mauve/mauve.html>), LaserGene 11 (DNASTAR, США) и веб-ресурса BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Штаммы бактерий, депонированные в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск»: *S. aureus* Tr1 (B-7890), *S. aureus* Tr2 (B-7891), *S. aureus* Tr1C (B-7921) и *S. aureus* Tr2C (B-7922).

Нуклеотидные последовательности ДНК, размещенные в международной базе данных GenBank: KP100446.1 и KP100447.1

Результаты и обсуждение

Оценка чувствительности планктонных клеток и биопленок госпитальных штаммов бактерий к антисептикам и дезсредствам

В ходе исследования разработан трехэтапный метод сравнения чувствительности планктонных культур и бактериальных биопленок к антисептикам, включающий в себя: (1) предварительную оценку диапазонов минимальных по-

давяющих концентраций и минимальных бактерицидных концентраций методом микроразведений в бульоне; (2) определение МПК и МБК методом микрокапли и (3) определение МБК аппликативным методом.

Использование данного подхода для сравнительного анализа чувствительности к антибактериальным препаратам

планктонных клеток микроорганизмов и биопленок позволило выявить различия в чувствительности для грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также дрожжеподобных грибов (рис. 1).

Чувствительность микроорганизмов к антисептикам и дезинфектантам изучали на препаратах, относящихся к разным

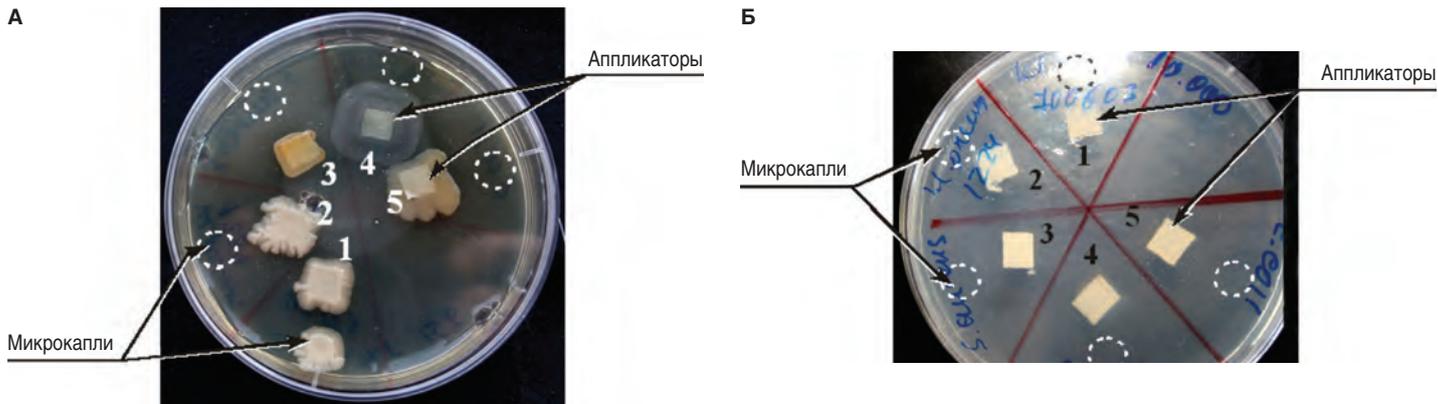


Рис. 1. Характер роста культур бактерий на питательной среде Муллера–Хинтона, содержащей хлоргексидин в концентрациях 0,02% (А) и 1,0% (Б). 1 – *K. pneumoniae* ATCC 700603, 2 – *K. pneumoniae* 1224, 3 – *S. aureus* 906, 4 – *P. aeruginosa* ATCC 27853, 5 – *E. coli* ATCC 25922.

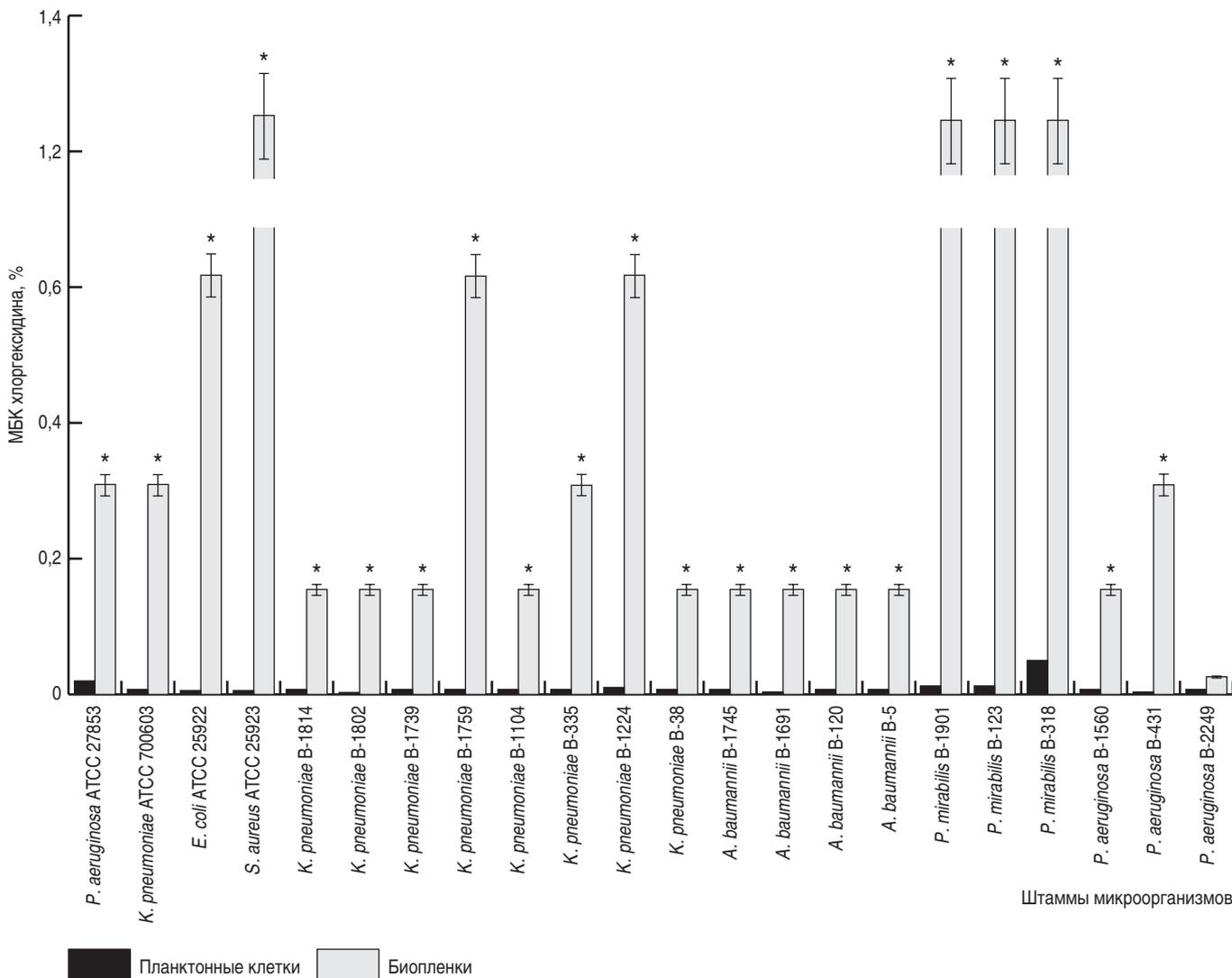


Рис. 2. Чувствительность бактерий к антисептику хлоргексидину в планктонном состоянии и в виде биопленок. Звездочкой отмечены значения МБК, превышающие рекомендованную производителем концентрацию.

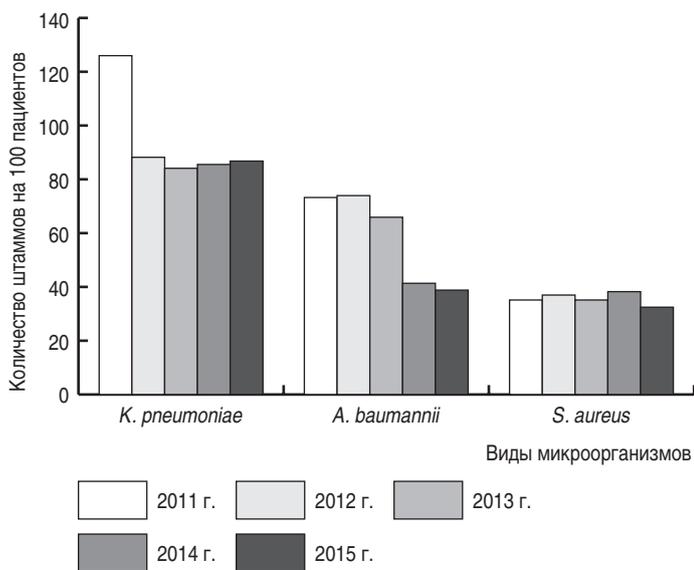


Рис. 3. Распространенность основных патогенов на 100 пациентов в отделении нейрореанимации г. Москвы [24].

функциональным классам: фенолы (хлоргексидин), четвертичные аммониевые соединения (ЧАС) (цетилпиридиния хлорид, мирамистин и бензалкония хлорид), амины («Мистраль»), хлорсодержащие («Део-хлор»), комбинированные дезсредства на основе кислородсодержащих соединений («Главкислород», «Тори ОКСИ» и «Беби Дез ультра»), комбинированные на основе ЧАС, альдегидов, гуанидина и аминов («Централь», «Тотус» и «Мистраль форте»).

Чувствительность бактерий к антисептику хлоргексидину изучали на коллекции референс-штаммов ($n = 4$), а также клинических изолятов ($n = 18$), выделенных в отделении нейрореанимации г. Москвы, отличающихся высокими уровнями устойчивости к антибактериальным препаратам, применяемым в клинической практике. Показано, что планктонные клетки нозокомиальных патогенов существенно чувствительнее к хлоргексидину, чем бактериальные клетки тех же штаммов в составе биопленки, что, по-видимому, связано с влиянием факторов, характерных для бактериальных биопленок (рис. 2).

Было установлено, что концентрация хлоргексидина, рекомендованная в инструкции по применению для ис-

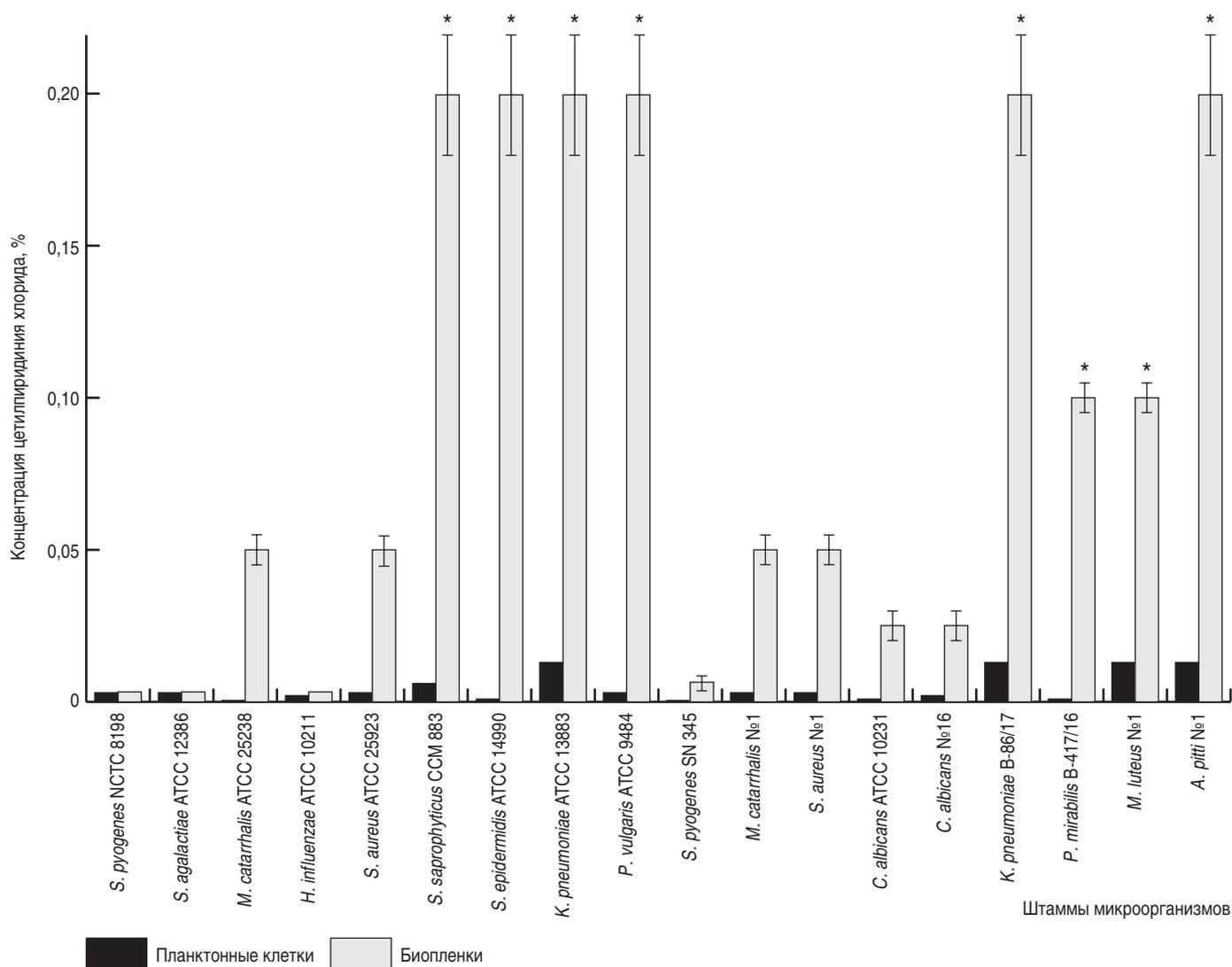


Рис. 4. Чувствительность микроорганизмов к антисептику цетилпиридиния хлориду в планктонном состоянии и в виде биопленок. Звездочкой отмечены значения МБК, превышающие концентрацию антисептика, применяемую в ополаскивателях для рта – 0,05%.

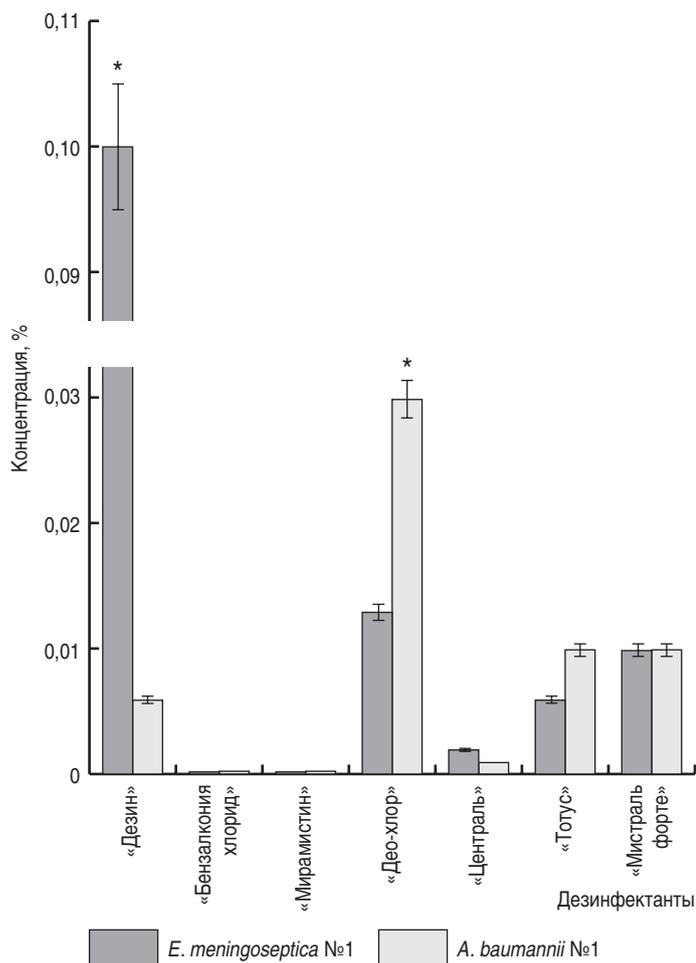


Рис. 5. Чувствительность планктонных клеток штаммов *E. meningoseptica* №1 и *A. baumannii* №1 к антисептикам и дезинфектантам разных функциональных классов. Звездочкой отмечены значения МБК, превышающие концентрации, применяемые в клинической практике.

пользования в качестве антисептика для обработки рук (0,5%), недостаточна для инактивации современных штаммов госпитальных патогенов. Нами предложено использование более высокой концентрации – 1,5% [20]. Применение хлоргексидина в концентрации 1,5% в программе ухода за пациентами отделения нейрореанимации г. Москвы позволило уменьшить интенсивность циркуляции патогенов – возбудителей нозокомиальных инфекций и снизить уровень заболеваемости инфекциями дыхательной системы пациентов, находящихся на искусственной вентиляции легких (рис. 3).

Чувствительность микроорганизмов к антисептику цетилпиридиния хлориду изучали на коллекции штаммов возбудителей инфекций верхних дыхательных путей, включающей референс-штаммы ($n = 10$) из международных коллекций и современные клинические штаммы, выделенные из клинических образцов при расследовании случаев инфекций по заданию Роспотребнадзора в 2016–2017 гг. ($n = 10$). Показано, что клетки всех использованных штаммов микроорганизмов, кроме двух штаммов *P. aeruginosa*, в планктонном состоянии чувствительны к антисептику цетилпиридиния хлориду в концентрации 0,05%, в то время, как в состоянии биопленки бактерии видов *P. aeruginosa*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *M. luteus* и *A. pittii* были устойчивы к данному антисептику в концентрациях 0,1–6,3% (рис. 4).

Чувствительность к антисептикам и дезсредствам разных функциональных классов, в том числе комбинированным препаратам, изучали на коллекции штаммов выделенных от пациентов детской реанимации Орловской области в 2016 г. ($n = 12$). Данные штаммы являются возбудителями серьезных инфекций у новорожденных и недоношенных детей, которые закончились летально.

Показано, что даже в планктонном состоянии клетки штамма *E. meningoseptica* №1 были устойчивы к антисепти-

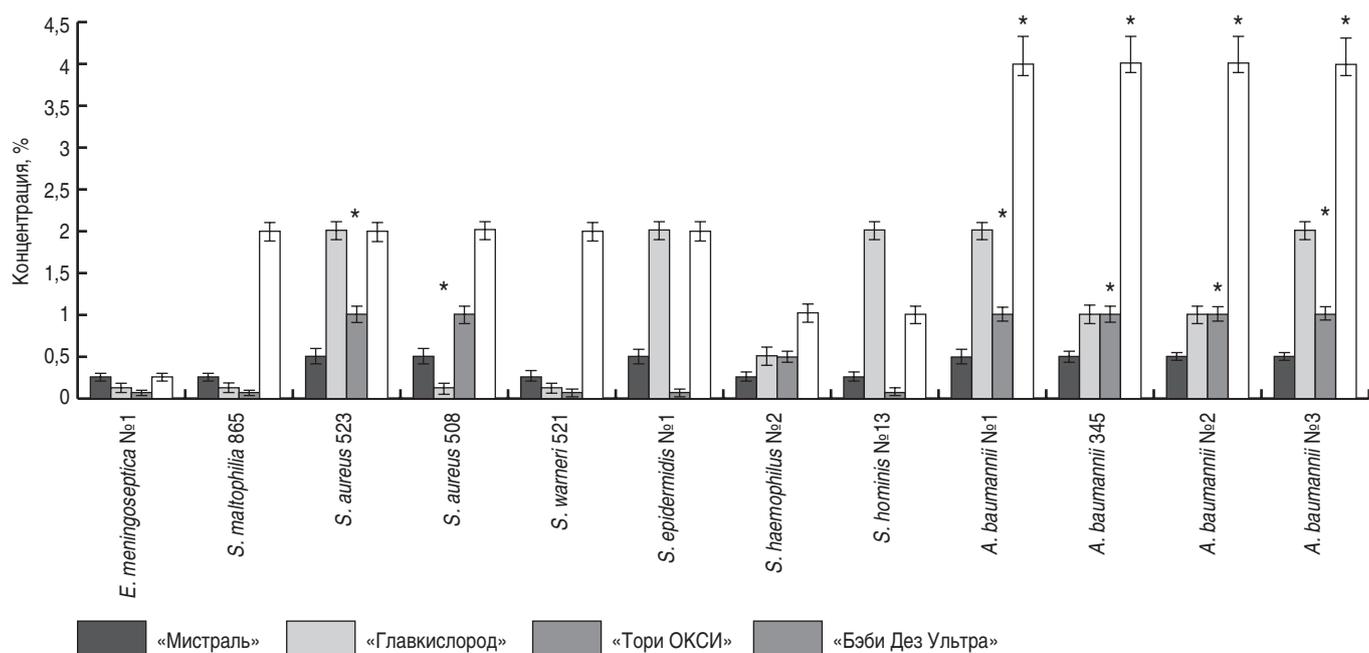


Рис. 6. Чувствительность биопленок штаммов бактерий, выделенных от пациентов реанимации новорожденных Орловской области в 2016 г. Звездочкой отмечены значения МБК, превышающие концентрации, применяемые в клинической практике.

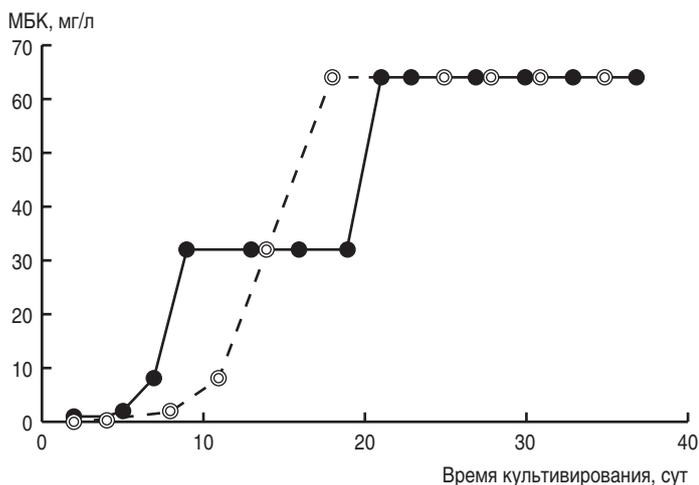


Рис. 7. Формирование устойчивости штамма *S. aureus* ATCC25923 к триклозану в жидкой питательной среде.

ку хлоргексидину, а клетки штамма *A. baumannii* №1 – к дезинфектанту «Део-хлор» в рабочих концентрациях (рис. 5).

Для биопленки клинических штаммов, выделенных в реанимации новорожденных Орловской области ($n = 12$), выявлена разная степень чувствительности препаратам дезинфектантов: к препаратам «Мистраль» и «Главкислород» все штаммы были чувствительны, а к кислородсодержащим препаратам «Тори ОКСИ» и «Беби Дез ультра» штаммы стафилококков и ацинетобактеров были нечувствительны (рис. 6).

Изучение закономерностей формирования устойчивости к антисептикам

а) Формирование устойчивости к триклозану у *S. aureus*

Формирование устойчивости к антисептикам у микроорганизмов изучали на примере триклозана (функциональный класс фенолов) и цетилпиридиния хлорида (функциональный класс четвертичных аммониевых соединений). Селекцию устойчивых к антисептикам вариантов бактерий видов *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* осуществляли путем последовательных пересевов культуры в питательном бульоне, содержащем ступенчато повышающиеся

концентрации антисептика в течение 20–60 дней.

Анализ динамики формирования устойчивости к триклозану штамма *S. aureus* ATCC25923 в двух независимых экспериментах показал, что формирование двух триклозан-устойчивых штаммов отличалось – у штамма *S. aureus* Tr1 устойчивость возникла в интервале между 2-м и 8-м пассажами, а у штамма *S. aureus* Tr2 – между 3-м и 6-м пассажами (рис. 7).

Показано, что приобретенная устойчивость к триклозану стабильно наследовалась у обоих штаммов: при пересевах на плотной питательной среде, не содержащей триклозана, в течение 26 месяцев штаммы *S. aureus* Tr1 и Tr2 сохраняли устойчивость к триклозану на прежнем уровне (МПК = 64 мг/л). Полученные в результате культивирования без селективного давления триклозана штаммы обозначены *S. aureus* Tr1C и Tr2C.

Параметры роста резистентных к триклозану вариантов штамма *S. aureus* ATCC25923 –Tr1, Tr1C, Tr2 и Tr2C, по сравнению с исходным штаммом *S. aureus* ATCC25923, были не одинаковы: триклозан-устойчивые штаммы линии Tr1 отличались несколько замедленным ростом – у них было увеличено время одной генерации G_T (34 ± 1 мин по сравнению с 29 ± 2 мин у исходного штамма) и время достижения колониями диаметра 1 мм t_{1mm} (23 ± 2 ч по сравнению с 15 ± 2 ч), а триклозан-устойчивые штаммы линии Tr2 имели скорость роста, сопоставимую с исходным штаммом.

Анализ геномов триклозан-устойчивых штаммов *S. aureus* с помощью классической ПЦР и полногеномного секвенирования выявил наличие точечной нуклеотидной замены C284T в гене *fabI*, описанной ранее в научной литературе и ассоциированной с триклозан-устойчивостью у стафилококков [25]. Кроме того, в штамме *S. aureus* Tr1 дополнительно выявлены две неописанные ранее в научной литературе мутации: (1) мутация G491A в гене гипотетического транспортного белка «HlyC/CorC family transporter», которая приводит к аминокислотной замене аргинина на гистидин R164H; (2) мутация C137T в гене белка-антипортера «Na⁺/H⁺ antiporter subunit F», связанного с устойчивостью к высоким концентрациям ионов Na⁺, K⁺, Li⁺ и щелочам, приводящая к аминокислотной замене метионина на изолейцин M46I. В штамме *S. aureus* Tr2, помимо мутации C284T, идентифи-

	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> Tr1	<i>S. aureus</i> Tr1C		
Позиция	Нуклеотид	Нуклеотид	Нуклеотид	Аминокислотная замена	
692033	A	A	A		
718642	G	A	A	R 164 H	«гипотетический» транспортный белок
872262	C	T	T	M 46 I	
901066	A	A	A		белок-антипортер, связанный с устойчивостью к высоким концентрациям Na ⁺ , K ⁺ , Li ⁺ и щелочам
949792	A	A	G		
950082	C	T	T	A 95 V	
965576	C	T	C		<i>fabI</i>

	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> Tr2	<i>S. aureus</i> Tr2C		
Позиция	Нуклеотид	Нуклеотид	Нуклеотид	Аминокислотная замена	
949792	A	A	A		мембранный
950082	C	T	T	A 95 V	
965576	C	C	C		гистидинкиназа
1716398	T	T	T		
1862440	A	G	G	I 82 V	<i>fabI</i>
2062764	G	G	G		
2063041	G	T	T	E 286	
2320517	C	C	C		

Рис. 8. Нуклеотидные и аминокислотные замены, выявленные в триклозан-устойчивых штаммах, по сравнению с исходным штаммом *S. aureus* ATCC25923.

цированы еще две неописанные ранее мутации: (1) мутация A545G в гене мембранного гипотетического белка, приводящая к аминокислотной замене изолейцина на валин – I82V и (2) мутация G857T в гене АТФ-связывающего белка «АТФ-binding protein», которая приводит к образованию стоп-кодона вместо триплета, кодирующего глутаминовую кислоту – E86I. Интересно, что мутация C284T в гене еноил-ацил-редуктазы, а также описанные дополнительные мутации в генах гипотетического транспортного белка (G491A), белка-антипортера (C137T), мембранного белка (A545G) и АТФ-связывающего белка (G857T) стабильно наследовались при культивировании бактерий в отсутствие селективного давления триклозана (рис. 8).

Мутация в гене *fabI*, по-видимому, очень важна для формирования устойчивости к триклозану, так как зафиксирована нами в двух независимых вариантах триклозан-устойчивых штаммов, а также описана в публикациях других авторов. Важно также, что другие описанные в резистентных штаммах мутации локализованы в генах, ассоциированных с транспортом веществ в клетке. Это еще раз подтверждает важность транспортной функции бактериальной клетки при формировании устойчивости к триклозану.

б) Формирование устойчивости к цетилпиридиния хлориду у *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *C. albicans*

Формирование устойчивости к антисептику цетилпиридиния хлориду изучали на коллекции типовых штаммов *K. pneumoniae* ATCC13883, *P. aeruginosa* ATCC10145, *S. aureus* ATCC25923 и *C. albicans* ATCC10231, которые относятся к видам наиболее характерных возбудителей инфекций верхних дыхательных путей.

Анализ динамики формирования устойчивости к цетилпиридиния хлориду показал, что штамм *P. aeruginosa* ATCC10145 в условиях селективного давления ступенчато повышающихся концентраций антисептика, достаточно быстро (в течение 23 дней, 8 пассажей) сформировал устойчивость к концентрации 150 000 мг/л (15%) этого препарата, уровень устойчивости штамма при этом увеличился в 300 раз по сравнению с исходным (рис. 9А).

Устойчивость к цетилпиридиния хлориду в концентрации, превышающей используемую в стоматологии, при пассировании в условиях селективного давления отмечен также у штамма *K. pneumoniae* ATCC13883: за 44 су (12 пассажей) получен вариант штамма, устойчивый к 4000 мг/л (0,4%)

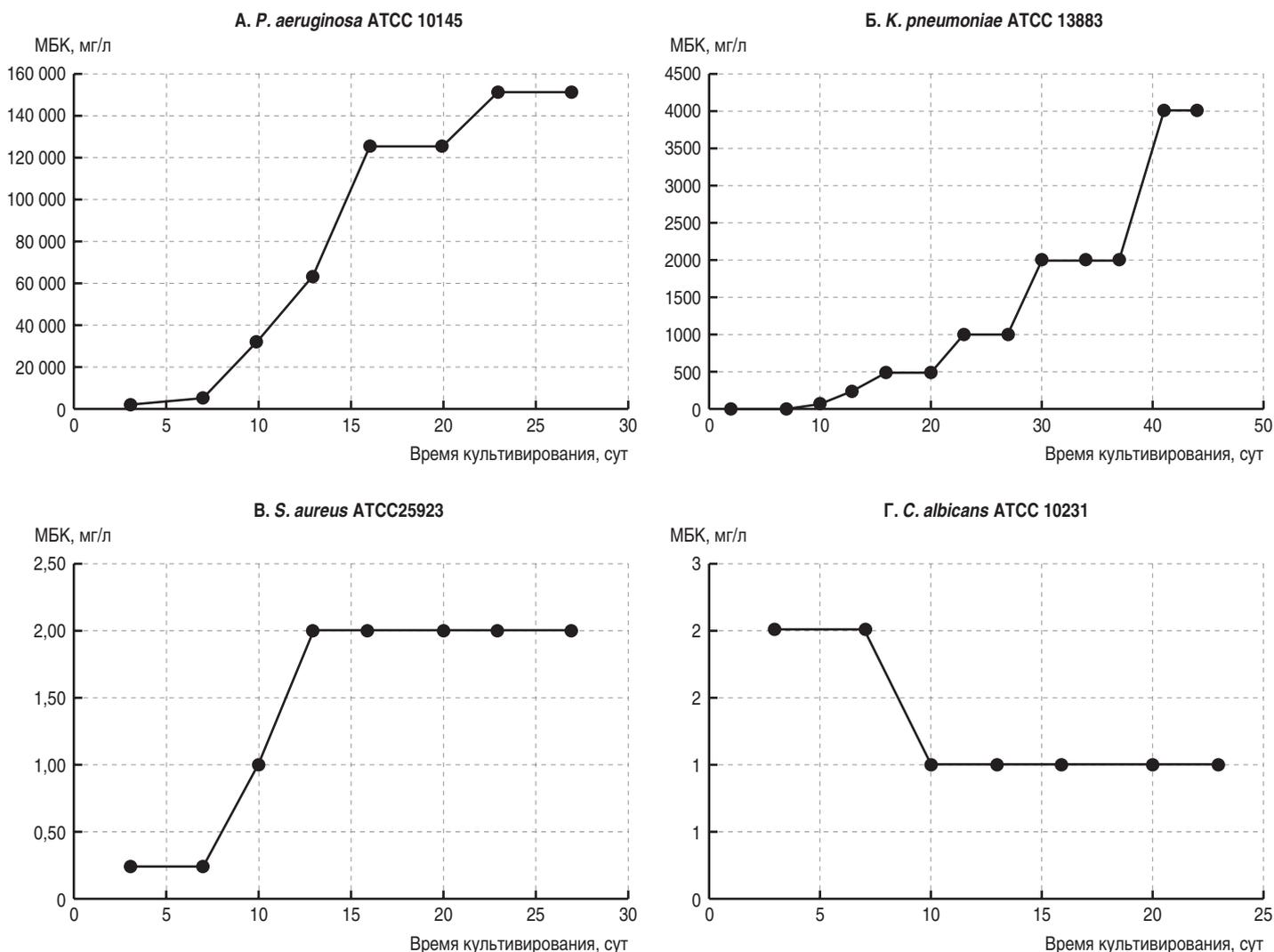


Рис. 9. Формирование устойчивости к цетилпиридиния хлориду в жидкой питательной среде у штаммов *P. aeruginosa* ATCC 10145 (А), *K. pneumoniae* ATCC 13883 (Б), *S. aureus* ATCC25923 (В) и *C. albicans* ATCC 10231 (Г).

препарата, что в 500 раз превышает исходный уровень (рис. 9Б).

Штамм стафилококка *S. aureus* ATCC25923 не сформировал устойчивого к используемой в клинической практике концентрации цетилпиридиния хлорида варианта: за 27 суток (8 пассажей) в условиях селективного давления антисептика произошло повышение МБК в 8 раз до концентрации 2 мг/л (0,0002%), что не выходит за рамки чувствительности (рис. 9В).

Культивирование штамма патогенного дрожжеподобного гриба *C. albicans* ATCC10231 в условиях селективного давления цетилпиридиния хлорида не привело к получению устойчивых клонов, более того, при пассировании в течение 23 сут (7 пассажей) значение МБК антисептика для данного штамма понизилось с 2 мг/л (0,0002%) до 1 мг/л (0,0001%) (рис. 9Г).

Заключение

В ходе исследования разработан методический подход, позволяющий проводить сравнительный анализ чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, в том числе к антисептикам и дезинфектантам, в планктонном состоянии и для биопленок. С помощью данного подхода показано, что в подавляющем большинстве случаев биопленки современных клинических штаммов, проявляют значительно большую устойчивость к антибактериальным препаратам, по сравнению с планктонными клетками.

На основании полученных результатов была установлена эффективная концентрация хлоргексидина против клинических штаммов бактерий, составляющая не менее 1,5%, применение которой в программе ухода за пациентами отделения нейрореанимации г. Москвы позволило уменьшить интенсивность циркуляции патогенов – возбудителей нозокомиальных инфекций и снизить уровень заболеваемости инфекциями дыхательной системы пациентов, находящихся на искусственной вентиляции легких.

Показано, что в условиях селективного давления субингибирующих концентраций антисептиков (на примере антисептиков разных функциональных классов – хлоргексидина и цетилпиридиния хлорида) микроорганизмы способны формировать резистентные клоны, причем представители некоторых видов демонстрировали высокую скорость и эффективность данного процесса (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и *S. aureus*).

На примере штамма *S. aureus* ATCC25923 показано с помощью полногеномного секвенирования, что молекулярным механизмом формирования устойчивости к антисептикам (триклозан) является накопление мутаций в генах, ассоциированных с мишенями действия антибактериальных препаратов (ген *fabI* для триклозана), а также в генах, ассоциированных с транспортом веществ в клетке.

Углубленный анализ чувствительности к антибактериальным препаратам у представителей госпитальных патогенов, включая моделирование бактериальных биопленок для оценки реальной чувствительности к антисептикам и дезинфектантам, а также изучение молекулярно-генетических механизмов адаптации бактерий к антисептическим препаратам, является весьма актуальным и важным научным на-

правлением, необходимым для совершенствования контроля внутрибольничных инфекций в Российской Федерации.

Финансирование работ

Данная работа выполнена в рамках Федеральных НИР Роспотребнадзора №049 «Мониторинг и изучение свойств возбудителей пищевых и госпитальных инфекций, разработка средств их диагностики» и №062 «Геномный, протеомный и метагеномный анализ штаммов, депонированных в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур («ГКПМ-Оболensk»)».

Литература

1. Bardossy AC, Zervos J, Zervos M. Preventing Hospital-acquired Infections in Low-income and Middle-income Countries: Impact, Gaps, and Opportunities. *Infect Dis Clin North Am.* 2016 Sep;30(3):805-18. DOI: 10.1016/j.idc.2016.04.006
2. Попова АЮ, Ежлова ЕБ, Игонина ЕИ. Надзор за соблюдением санитарно-эпидемиологического законодательства при оказании медицинской помощи в целях обеспечения ее качества и безопасности. *Вестник Росздравнадзора.* 2016;1:74-8.
3. Авчинников АВ, Егоричева СД. Гигиенические аспекты профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи в акушерских стационарах. *Вестник Смоленской государственной медицинской академии.* 2015; 14(3):92-6.
4. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2014 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015; 206 с.
5. Медведева ВВ, Богданова ОЮ. Заболевания новорожденных и родильниц за 10 лет с 2000-по 2010 гг., вызванные бактериями рода Стафилококк, вида *St. Neamolyticus* в г. Мончегорске Мурманской области. *Здоровье населения и среда обитания.* 2011;9:8-13.
6. Oliveira A, Pereira VC, Pinheiro L, Riboli DFM, Martins KB, Cunha Oliveira ML. Antimicrobial Resistance Profile of Planktonic and Biofilm Cells of *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative *Staphylococci*. *Int J Mol Sci.* 2016 Sep 1;17(9). pii: E1423. DOI: 10.3390/ijms17091423
7. Любасовская ЛА, Корниенко МА, Припутневич ТВ. Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика коагулазонегативных стафилококков, выделенных у новорожденных отделения реанимации и интенсивной терапии. *Антибиотики и химиотерапия.* 2013;58(3-4):25-32.
8. Falco A, Ramos Y, Franco E, Guzmán A, Takiff H. A cluster of *KPC-2* and *VIM-2*-producing *Klebsiella pneumoniae* ST833 isolates from the pediatric service of a Venezuelan Hospital. *BMC Infect Dis.* 2016 Oct 22;16(1):595. DOI: 10.1186/s12879-016-1927-y
9. Chatterjee S, Datta S, Roy S, Ramanan L, Saha A, Viswanathan R, et al. Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* and Other *Acinetobacter* spp. Causing Neonatal Sepsis: Focus on NDM-1 and Its Linkage to ISAba125. *Front Microbiol.* 2016 Aug 8;7:1126. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01126
10. Walker J, Jhutti A, Parks S, Willis C, Copley V, Turton JF, et al. Investigation of healthcare-acquired infections associated with *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in taps in neonatal units in Northern Ireland. *J Hosp Infect.* 2014 Jan;86(1):16-23. DOI: 10.1016/j.jhin.2013.10.003
11. Munton TJ, Russell AD. Aspects of the action of glutaraldehyde on *Escherichia coli*. *J. Appl. Bacteriol.* 1970;33:410-9.
12. Баринов АЛ, Корначев АС. Эпидемиологический надзор за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, в отделениях патологии новорожденных на основе нового подхода к организации микробиологического мониторинга. *Здоровье населения и среда обитания.* 2015;2:42-4.

13. Яковлева СВ, Сидоренко СВ, Рафальского ВВ, Спичак ТВ. Стратегия и тактика рационального применения антимикробных средств в амбулаторной практике: Российские практические рекомендации. М.: Издательство Престо, 2014; 121 с.
14. Svensater G, Welin J, Wilkins JC, Beighton D, Hamilton IR. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol Lett. 2001 Nov 27;205(1):139-46.
15. Lanjri S, Uwingabiye J, Frikh M, Abdellatifi L, Kasouati J, Maleb A, et al. In vitro evaluation of the susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolates to antiseptics and disinfectants: comparison between clinical and environmental isolates. Antimicrob Resist Infect Control. 2017 Apr 11;6:36. DOI: 10.1186/s13756-017-0195-y
16. Huang XZ. Characteristics of plasmids in multi-drug-resistant *Enterobacteriaceae* isolated during prospective surveillance of a newly opened hospital in Iraq. PLoS One. 2012;7(7):e40360. DOI: 10.1371/journal.pone.0040360
17. Kaase M. Carbapenemases in gram-negative bacteria: Current data and trends of resistance resulting from the work of national reference centres. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2012 Nov;55(11-12):1401-4. DOI: 10.1007/s00103-012-1552-x
18. Национальная Концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Утверждена Главным государственным санитарным врачом РФ 6 ноября 2011 г. [Электронный ресурс]. Режим доступа <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70000121/#70000121> (дата обращения 29.08.2016).
19. Подкопаев ЯВ, Домотенко ЛВ, Морозова ТП, Храмов МВ, Шепелин АП. Отечественные питательные среды для диагностики гнойных бактериальных менингитов. Клиническая лабораторная диагностика. 2015;5:59-64.
20. Детушева ЕВ, Родин ВБ, Слукин ПВ, Ершова ОН, Александрова ИА, Сазыкина СЮ, и др. Чувствительность нозокомиальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и *Proteus mirabilis* к антисептику на основе хлоргексидина. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2015;17(1):57-6.
21. Родин ВБ, Паников НС, Кобелев ВС, Акимова НА, Холоденко ВП. Упрощенная модель роста колоний одноклеточных микроорганизмов и ее использование для оценки воздействия биоцидов на микробные клетки. Прикладная биохимия и микробиология. 1998;34(4):403-9.
22. Thomas JC, Khoury R, Neeley CK, Akroush AM, Davies EC. Fast CTAB Method of Human DNA Isolation for Polymerase Chain Reaction Applications. Biochem. 1997;25(4):233-5.
23. Nielsen LN, Larsen MH, Skovgaard S, Kastbjerg V, Westh H, Gram L, Ingmer H.. *Staphylococcus aureus* but not *Listeria monocytogenes* adapt to triclosan and adaptation correlates with increased *fabI* expression and *agr* deficiency. BMC Microbiol. 2013 Jul 30;13:177. DOI: 10.1186/1471-2180-13-177
24. Ершова ОН, Александрова ИА, Сазыкина СЮ, Курдюмова НВ. Тезисы XVII Международного конгресса МАКМАХ по антимикробной терапии. Москва, 20-22 мая 2015 г. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2015;17(2) Прил. 1:17.
25. Ciusa ML, Furi L, Knight D, Decorosi F, Fondi M, et al. A novel resistance mechanism to triclosan that suggests horizontal gene transfer and demonstrates a potential selective pressure for reduced biocide susceptibility in clinical strains of *Staphylococcus aureus*. Int J Antimicrob Agents. 2012 Sep;40(3):210-20. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2012.04.021
- in order to ensure its quality and safety. Vestnik Roszdravnadzora. 2016;1:74-8. (In Russian).
3. Avchinnikov AV, Egoricheva SD. Hygienic aspects of prevention of healthcare associated infection in maternity homes. Vestnik of the Smolensk State Medical Academy. 2015;14(3):92-6. (In Russian).
4. On the sanitary-epidemiological situation in Russian Federation in 2014: State report. Moscow, 2015; 206 p. (In Russian).
5. Medvedev VV, Bogdanova OU. Diseases of newly-born children and puerperant,s during 10 years, from 2000 till 2010, caused by bacteroides *Staphylococcus*, *St. haemolyticus* in Monchegorsk Murmansk region. Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya. 2011;9:8-13. (In Russian).
6. Oliveira A, Pereira VC, Pinheiro L, Riboli DFM, Martins KB, Cunha Oliveira ML. Antimicrobial Resistance Profile of Planktonic and Biofilm Cells of *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci. Int J Mol Sci. 2016 Sep 1;17(9). pii: E1423. DOI: 10.3390/ijms17091423
7. Lubasovskaya LA, Kornienko MA, Pripitnevich TV, Ilyina EN, Shchegolev AI. Microbiological and Molecular Genetic Characteristics of Coagulase-Negative Staphylococcal Isolates from Neonates in Intensive Care Unit. Antibiotics and Chemotherapy. 2013;58(3-4):25-32. (In Russian).
8. Falco A, Ramos Y, Franco E, Guzmán A, Takiff H. A cluster of *KPC-2* and *VIM-2*-producing *Klebsiella pneumoniae* ST833 isolates from the pediatric service of a Venezuelan Hospital. BMC Infect Dis. 2016 Oct 22;16(1):595. DOI: 10.1186/s12879-016-1927-y
9. Chatterjee S, Datta S, Roy S, Ramanan L, Saha A, Viswanathan R, et al. Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* and Other *Acinetobacter* spp. Causing Neonatal Sepsis: Focus on NDM-1 and Its Linkage to ISAba125. Front Microbiol. 2016 Aug 8;7:1126. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01126
10. Walker J, Jhutti A, Parks S, Willis C, Copley V, Turton JF, et al. Investigation of healthcare-acquired infections associated with *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in taps in neonatal units in Northern Ireland. J Hosp Infect. 2014 Jan;86(1):16-23. DOI: 10.1016/j.jhin.2013.10.003
11. Munton TJ, Russell AD. Aspects of the action of glutaraldehyde on *Escherichia coli*. J. Appl. Bacteriol. 1970;33:410-9.
12. Barinov AL, Kornachyov AS. Epidemiological surveillance of healthcare associated infections in neonatal pathology units-based on a new approach in microbiological monitoring organisation. Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya. 2015;2:42-4. (In Russian).
13. Yakovleva SV, Sidorenko SV, Rafal'skogo VV, Spichak TV. Strategy and tactics for the rational use of antimicrobial agents in ambulatory practice: Russian practical recommendations. Moscow: "Presto" Publ., 2014; 121 p. (In Russian).
14. Svensater G, Welin J, Wilkins JC, Beighton D, Hamilton IR. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol Lett. 2001 Nov 27;205(1):139-46.
15. Lanjri S, Uwingabiye J, Frikh M, Abdellatifi L, Kasouati J, Maleb A, et al. In vitro evaluation of the susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolates to antiseptics and disinfectants: comparison between clinical and environmental isolates. Antimicrob Resist Infect Control. 2017 Apr 11;6:36. DOI: 10.1186/s13756-017-0195-y
16. Huang XZ. Characteristics of plasmids in multi-drug-resistant *Enterobacteriaceae* isolated during prospective surveillance of a newly opened hospital in Iraq. PLoS One. 2012;7(7):e40360. DOI: 10.1371/journal.pone.0040360
17. Kaase M. Carbapenemases in gram-negative bacteria: Current data and trends of resistance resulting from the work of national reference centres. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2012 Nov;55(11-12):1401-4. DOI: 10.1007/s00103-012-1552-x
18. The national Concept of prevention of infections associated with health care. Approved Chief state sanitary doctor of the Russian Federation November 6, 2011. [Internet]. Available at <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70000121/#70000121> (accessed 29.08.2016). (In Russian).

References

1. Bardossy AC, Zervos J, Zervos M. Preventing Hospital-acquired Infections in Low-income and Middle-income Countries: Impact, Gaps, and Opportunities. Infect Dis Clin North Am. 2016 Sep;30(3):805-18. DOI: 10.1016/j.idc.2016.04.006
2. Popova AY, Ezhlova EB, Igonina EP, Melnikova AA, Frolova NV. Supervision over compliance with sanitary-epidemiological legislation in the provision of healthcare

19. Podkopaev YaV, Domotenko LV, Morozova TP, Khramov MV, Shepelin AP. The national nutrient medium for diagnostic of purulent bacterial meningitis. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2015;5:59-64. (In Russian).
20. Detusheva EV, Rodin VB, Slukin PV, Ershova ON, Aleksandrova IA, Kurdyumova NV, et al. Susceptibility of Nosocomial *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, and *P. mirabilis* Strains to a Chlorhexidine-Based Antiseptic Preparation. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2015;17(1):57-6. (In Russian).
21. Rodin VB, Panikov NS, Kobelev VS, Akimova NA, Kholodenko VP. Simplified model of increase in colony diameter during growth of unicellular microorganisms and its use in evaluating the effect of biocides on microbial cells. Applied Biochemistry and Microbiology. 1998;34(4):403-9. (In Russian).
22. Thomas JC, Khoury R, Neeley CK, Akroush AM, Davies EC. Fast CTAB Method of Human DNA Isolation for Polymerase Chain Reaction Applications. Biochem. 1997;25(4):233-5.
23. Nielsen LN, Larsen MH, Skovgaard S, Kastbjerg V, Westh H, Gram L, Ingmer H.. Staphylococcus aureus but not Listeria monocytogenes adapt to triclosan and adaptation correlates with increased fabI expression and agr deficiency. BMC Microbiol. 2013 Jul 30;13:177. DOI: 10.1186/1471-2180-13-177
24. Ershova ON, Aleksandrova IA, Sazykina SYu, Kurdyumova NV. Tezisy XVII Mezhdunarodnogo kongressa MAKMAKh po antimikrobnoi terapii. Moscow, 20-22 May 2015. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2015;17(2) Прил. 1:17. (In Russian).
25. Ciusa ML, Furi L, Knight D, Decorosi F, Fondi M, et al. A novel resistance mechanism to triclosan that suggests horizontal gene transfer and demonstrates a potential selective pressure for reduced biocide susceptibility in clinical strains of *Staphylococcus aureus*. Int J Antimicrob Agents. 2012 Sep;40(3):210-20. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2012.04.021

Информация об авторах:

Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0003

Детушева Елена Владимировна, кандидат биологических наук, сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0003

Мицевич Ирина Петровна, научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0003

Детушев Константин Владимирович, научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0003

Подкопаев Ярослав Васильевич, младший научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279 Россия, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: +7 (4967) 36-0017

Information about authors:

Ivan A. Dyatlov, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med), Professor, Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0003

Elena V. Detusheva, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Antimicrobial Agents Lab., Molecular Microbiology Dep., FBIS State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0003

Irina P. Mitsevich, Researcher of Antimicrobial Agents Lab., Molecular Microbiology Dep., FBIS State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0003

Konstantin V. Detushev, Researcher of Microbial Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0003

Yaroslav V. Podkopaev, Scientist of Nutrient Media Lab., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: +7 (4967) 36-0017
 E-mail: polosenko@obolensk.org

НОВОСТИ НАУКИ

Группа исследователей из Университета Центральной Флориды открыли новое потенциальное средство борьбы с туберкулезом

Дормантная форма *Mycobacterium tuberculosis* представляет собой серьезную проблему при лечении заболевания, поскольку эти бактерии являются толерантными к препаратам первой линии. Поэтому крайне важно найти новые соединения, которые эффективно уничтожают неактивные бактерии. Путем скрининга 4400 образцов морских природных продуктов были идентифицированы соединения, избирательно активные против покоящихся форм возбудителя туберкулеза. Структуры пяти очищенных активных соединений были определены методом ЯМР и масс-спектрометрии.

Rodrigues Felix C. et al.

Selective Killing Of Dormant *Mycobacterium tuberculosis* By Marine Natural Products. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2017. P. AAC.00743-17.

Морфофункциональные особенности высокочувствительных к дезинфицирующим средствам бактерий *Escherichia coli* K-12 при воздействии дезинфицирующего средства «Тотус»

В.Н.Герасимов¹, А.Е.Конев², Н.Б.Роганова², Р.Л.Гутерман², А.И.Комарова²,
Н.В.Киселева¹, Е.В.Быстрова¹, Ю.В.Герасимова¹, С.А.Котов¹, М.В.Храмов¹

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

²ООО «МК ВИТА-ПУЛ», Москва, Российская Федерация

Приведены результаты сравнительных исследований воздействия дезинфицирующего средства «Тотус», содержащего в качестве действующих веществ алкилдиметилбензиламмоний хлорид (5,0%) и алкилдиамин ацетат (5,5%), на культуру *Escherichia coli* K-12, выбранную в качестве тест-микроорганизма, имитирующего высокочувствительные бактерии возбудителей опасных и особо опасных инфекций к действию различных дезинфицирующих средств. С помощью микробиологических, физико-химических и электронно-микроскопических методов установлено, что механизм действия дезинфицирующего средства связан с проникновением средства через цитоплазматическую мембрану. Механизм гибели *E. coli* запускается через 15 мин после начала обработки микробных клеток 0,05% рабочим раствором дезинфицирующего средства. Потеря жизнеспособности клеток наблюдается к концу 45-минутной инкубации (микробиологический метод), в то время как полное лизирование культуры происходило через 60 мин (физико-химический метод), а полное отсутствие интактных клеток – через 60–120 мин (электронно-микроскопическое исследование).

Ключевые слова: дезинфицирующее средство, микробиологические, физико-химические, электронно-микроскопические методы исследований, ультраструктура клеток

Для цитирования: Герасимов В.Н., Конев А.Е., Роганова Н.Б., Гутерман Р.Л., Комарова А.И., Киселева Н.В., Быстрова Е.В., Герасимова Ю.В., Котов С.А., Храмов М.В. Морфофункциональные особенности высокочувствительных к дезинфицирующим средствам бактерий *Escherichia coli* K-12 при воздействии дезинфицирующего средства «Тотус». Бактериология. 2017; 2(2): 59–65. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-59-65

Morfo-functional features of highly sensitive to disinfectants bacteria *Escherichia coli* K-12 after influence of disinfectant «Totus»

V.N.Gerasimov¹, A.E.Konev², N.B.Roganova², R.L.Guterman², A.I.Komarova²,
N.V.Kiseleva¹, E.V.Bystrova¹, Yu.V.Gerasimova¹, S.A.Kotov¹, M.V.Khramov¹

¹State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology" Rosпотребнадзор, Obolensk, Russian Federation;

²«МК ВИТА-ПУЛ», Ltd., Moscow, Russian Federation

Antimicrobial effect of disinfectant of «TOTUS» containing alkyldimethylbenzylammonium chloride (5,0%) and alkyldiamin acetate (5,5%) on the culture of *Escherichia coli* K-12 has been investigated. Effect of the disinfectant is caused by penetration of the agent through a cytoplasmic membrane. Depression of viability of *E. coli* is observed under the influence of 0,05% of the disinfectant within 15 min. The microbiological method showed that the death of cells is observed in 45 minutes. The culture lysis is recorded in 60 min (method Lowry), and total absence of living cells in 60-120 min (submicroscopy).

Keywords: disinfectant, microbiological method, submicroscopy method, metastructure of cells

For citation: Gerasimov V.N., Konev A.E., Roganova N.B., Guterman R.L., Komarova A.I., Kiseleva N.V., Bystrova E.V., Gerasimova Yu.V., Kotov S.A., Khramov M.V. Morfo-functional features of highly sensitive to disinfectants bacteria *Escherichia coli* K-12 after influence of disinfectant «Totus». Bacteriology. 2017; 2(2): 59–65. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-59-65

Для корреспонденции:

Герасимов Владимир Николаевич, доктор биологических наук, заведующий отделом дезинфектологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н., пос. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 31-2044

E-mail: ilcvngerasimov@obolensk.org

Статья поступила 12.12.2016 г., принята к печати 30.06.2017 г.

For correspondence:

Vladimir N. Gerasimov, Dr. Sci (Biol.), Head of Desinfectology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB, 142279, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 31-2044

E-mail: ilcvngerasimov@obolensk.org

The article was received 12.12.2016, accepted for publication 30.06.2017

Усовершенствование разработчиками дезинфицирующих средств проводится в нескольких направлениях: создание новых композиций из существующих действующих веществ; введение в состав дезинфицирующих средств синергетических добавок, усиливающих действие активных компонентов; использование в качестве действующих веществ новых химических субстанций.

В 2014 г. медицинской компанией «ВИТА-ПУЛ» разработано новое дезинфицирующее средство «ТОТУС», в котором впервые на отечественном рынке использована композиция, содержащая алкилдиметилбензиламмоний хлорид (5,0%) и алкилдиамин ацетат (5,5%), полученный в результате реакции взаимодействия алкилдиамина с уксусной кислотой.

Дезинфицирующее средство «ТОТУС» обладает антимикробной активностью в отношении возбудителей бактериальных инфекций, в том числе возбудителей особо опасных инфекций и туберкулеза, а также в отношении вирусов и грибов.

Средство предназначено для текущей и профилактической дезинфекции различных объектов в медицинских организациях, в т.ч. медицинских инструментов, включая эндоскопы; для обеззараживания медицинских отходов и биологических выделений.

В современных условиях большое значение уделяется изучению механизма действия дезинфицирующих средств, что обуславливает актуальность исследований по оценке воздействия средств на процесс разрушения бактериальных клеток [1]. Механизм действия дезинфицирующих средств определяется природой активного химического соединения и может быть связан с повреждением поверхностных структур (клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана), инактивацией ферментов, нарушением метаболизма и другими факторами. Так, при воздействии хлорсодержащих соединений происходит окисление белков и других компонентов клетки [2]. Поверхностно-активные вещества (ПАВ), как показали экспериментальные данные, повреждают цитоплазматические мембраны микроорганизмов, их антимикробная активность зависит от величины длинноцепочечного алкильного радикала [3, 4]. Производные гуанидина, по своей химической природе относящиеся к высокомолекулярным катионным ПАВ, избирательно взаимодействуют с карбоксильными группами аминокислот и кислых полисахаридов клеточной мембраны, что приводит к коагуляции содержимого микробных клеток. Эффективность дезинфицирующих средств на основе третичных алкиламинов связана с тотальным разрушением структурных компонентов клеток [5]. Кислородсодержащие соединения образуют свободные радикалы, которые повреждают белки и липиды цитоплазматических мембран, ДНК и другие компоненты микробной клетки [6].

В основе механизма действия альдегидсодержащих соединений лежит взаимодействие с амино- и сульфгидрильными группами белков, в результате чего происходит их денатурация.

Поскольку алкилдиамин ацетат является новой действующей субстанцией, то целью наших исследований было изучение особенностей взаимодействия дезинфицирующего средства «ТОТУС» с высокочувствительными к дезинфицирующим средствам клетками *E. coli* K-12.

Материалы и методы

В работе исследовали антимикробную активность дезинфицирующего средства «ТОТУС». Концентрация рабочего раствора равнялась 0,05%, время обработки от 15 до 120 минут. В качестве тестируемого микроорганизма выбрали культуру *Escherichia coli* K-12, полученную из музея ФБУН ГНЦ ПМБ, имитирующую высокочувствительные к различным дезинфицирующим средствам бактерии возбудителей колибактериоза, сальмонеллеза, инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) и др.

Исследование проводили с использованием микробиологических, физико-химических и электронно-микроскопических методов (табл. 1).

Культивирование *E. coli*. Подготовку образцов для детальных испытаний выполняли согласно Руководству Р 4.2.2643-10 [7]. С этой целью культуру выращивали на чашках Петри с плотной питательной средой ГРМ (производство ФБУН ГНЦ ПМБ) при температуре 37°C в течение 24 часов. Для приготовления рабочей суспензии суточную культуру смывали стерильным физиологическим раствором и разбавляли до концентрации 1×10^{10} кл/см³, соответствующей БАК-10 по оптическому стандарту мутности.

Обработка дезинфицирующим средством. В центрифужные пробирки вносили по 5,4 см³ дезинфицирующего средства рабочей концентрации и 0,6 см³ суспензии культуры (соотношение 9 : 1). Получали ряд проб суспензии культуры с концентрацией 1×10^9 кл/см³ в рабочем растворе дезинфицирующего средства. Образцы инкубировали 15, 30, 45, 60 и 120 мин при комнатной температуре. После этого часть суспензии отбирали для микробиологических исследований. Оставшуюся биомассу центрифугировали в течение 10 мин (центрифуга Beckman coulte, частота вращения 6000 об/мин) и из нее готовили образец для физико-химических и электронно-микроскопических исследований.

Определение жизнеспособности микроорганизмов микробиологическим методом. Для оценки эффективности действия дезинфицирующего средства 0,5 см³ взвеси культуры 1×10^{10} кл/см³ в рабочем растворе дезинфицирующего средства вносили в 4,5 см³ физиологического раствора и,

Таблица 1. Материалы и методы, применяемые в изучении антимикробного воздействия дезинфицирующего средства «ТОТУС» на бактерии *Escherichia coli* K-12

Дезинфицирующее средство, режим воздействия	Методы исследования	Проба	Критерии
«ТОТУС»	Микробиологический	Суспензия	Титр жизнеспособных бактерий
Концентрация рабочего раствора 0,05%	Физико-химический	Надосадочная жидкость	Концентрация белка и ДНК
Время выдержки 15–120 мин	Электронно-микроскопический	Ультратонкие срезы образцов осадка суспензии	Степень повреждения бактерий на основании цитоструктурных критериев

используя метод десятикратных серийных разведений, титровали до концентрации 10^2 кл/см³. Пробы высевали на чашки Петри с твердой питательной средой ГРМ. Учет результатов проводили через 24–48 ч.

Подготовка образцов для физико-химических исследований. Надосадочную жидкость пропускали через стерильную фильтрующую насадку фирмы CORNING с диаметром пор 0,2 мкм. После фильтрации жидкость исследовали на отсутствие живых бактерий. Далее в полученном лизате определяли концентрацию белка по методу Лоури [8], концентрацию ДНК – спектрофотометрически на длине волны 260 нм, предварительно разрушив белки протеиназой К в щелочных условиях. Для контроля разрушения белков растворы бактериальных лизатов анализировали на длине волны 260 нм и 280 нм и по соотношению A260/A280 определяли чистоту ДНК. Во всех опытах соотношение A260/A280 превышало 2, что свидетельствовало об эффективности разрушения белка и соответствовало стандартным требованиям, предъявляемым к ДНК.

Пробоподготовка для электронно-микроскопических исследований. К осадку биомассы *E. coli*, обработанной дезинфицирующим средством «ТОТУС», добавляли 5,4 см³ нейтрализатора, тщательно перемешивали, инкубировали 5 мин и повторно центрифугировали в течение 10 мин (частота вращения 6000 об/мин). Надосадочную жидкость удаляли, а к осадку добавляли 0,5 см³ 4% раствора глутарового альдегида в 0,2 М Na-какодилатном буфере pH 7,2. Фиксацию проводили в течение ночи при температуре 4°C. Дополнительную фиксацию проводили в 4% водном растворе оксида осмия (VIII) на буфере Райтер-Келленберга в течение ночи при температуре 4°C. После фиксации и отмывки в буфере микробные клетки дегидратировали в растворе этилового спирта возрастающей концентрации: по 15 мин в 30%, 50%, 70%, 95% спирте и 20 мин – в абсолютном спирте при его трехкратной смене. Далее образцы пропитывали смесями абсолютного этанола и аралдита (соотношения 3 : 1; 1 : 1; 1 : 3) при 37°C в течение суток, затем переносили в чистый аралдит и выдерживали в вакууме (10^{-2} торр) 1,5 ч при температуре 37°C. Заливали образцы аралдитом и полимеризовали при температуре 40°C в течение ночи, затем при температуре 60°C в течение 1 сут и при температуре 90°C в течение 2 сут. Срезы фиксированной биомассы получали стеклянным ножом на ультрамикротоме Ultracut (Reichert Jung, Австрия). Срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, просматривали в электронном микроскопе H-300 (Hitachi, Япония) при ускоряющем напряжении 75 кВ и увеличении от 15000 до 30000 крат, а также в просвечивающем электронном микроскопе FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN (FEI, Голландия, США).

Определение степени повреждения микроорганизмов методом электронной микроскопии. В основе метода электронно-микроскопического определения степени нарушения структуры и изменения жизненно важных органоидов бактерий лежит просмотр ультратонких срезов образцов и оценка состояния отдельных микроорганизмов биомассы на основании цитоструктурных критериев.

С этой целью каждый образец фотографировали по 15–20 раз, выбирая при этом случайные поля, на которых присутствовало 15–30 клеток. Полученные фотонегативы с изображением срезов бактерий помещали на световой экран и с помощью лупы просматривали ультраструктуру каждой клетки. Анализу подвергали только те клетки, на срезах которых выявляли клеточную стенку, цитоплазму и нуклеоид.

По признаку морфологической целостности клетки разделяли на 2 основные группы:

- интактные или неповрежденные клетки;
- поврежденные клетки, имеющие обратимые и необратимые повреждения.

Интактные клетки характеризуются наличием неповрежденной клеточной стенки с четким, непрерывным, трехслойным контуром внешней и цитоплазматической мембраны, отсутствием выраженного периплазматического пространства, так как клеточная стенка плотно прилегает к протопласту. При этом цитоплазма интактных клеток имеет гомогенное, мелкогранулярное строение средней электронной плотности, а нуклеоид – тонкое фибриллярное строение в виде компактной зоны, отличающейся по плотности от окружающей цитоплазмы.

В группу бактерий с повреждениями ультраструктуры входят:

- клетки, имеющие разрыв внешней мембраны, но сохранившие целостность цитоплазматической мембраны и с нарушенным строением цитоплазмы и нуклеоида;
- клетки с разрывом всех слоев клеточной стенки с истечением цитоплазмы и ее деструктивным изменением, а также с повреждением нуклеоида.

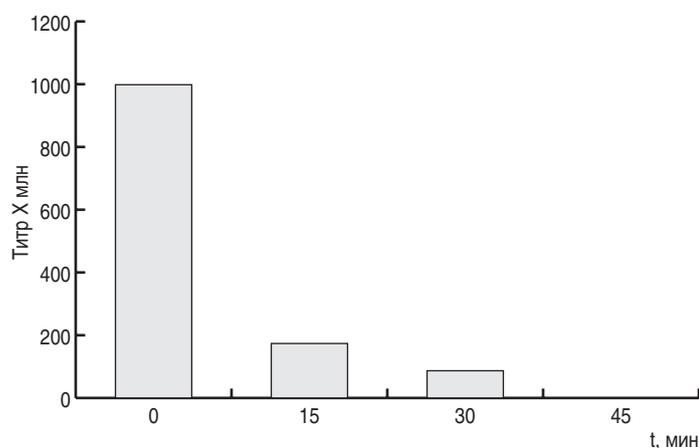


Рис. 1. Изменение титра живых клеток культуры *E. coli* K-12 в процессе обработки 0,05% раствором дезинфицирующего средства «ТОТУС».

Таблица 2. Результаты количественной оценки воздействия 0,05% раствора дезинфицирующего средства «ТОТУС» на клетки культуры *Escherichia coli* K-12, полученные микробиологическим и физико-химическим методами

Время выдержки, мин	Титр живых клеток в суспензии, кл/см ³	Концентрация белка, мг/см ³	Концентрация ДНК, мкг/см ³
0	1×10^9	$0,13 \pm 0,03$	$25,1 \pm 3,0$
15	$1,7 \times 10^8$	$0,36 \pm 0,03$ (60%)	$61,5 \pm 3,1$
30	$8,3 \times 10^7$	$0,50 \pm 0,03$	$69,5 \pm 3,5$
45	0	$0,57 \pm 0,03$	$84,2 \pm 4,4$
60	0	$0,60 \pm 0,03$ (100%)	$102,3 \pm 4,5$
120	0	$0,60 \pm 0,03$	$102,6 \pm 4,8$

После визуальной оценки фотографий, сделанных с помощью электронного микроскопа, проводили статистическую обработку результатов. В результате просмотра фотографий было отобрано около 500 изображений бактерий. С помощью методики цитологической оценки качества микробных клеток регистрировали количество клеток с интактной структурой.

На основании полученных результатов строили диаграммы, наглядно демонстрировавшие уровень повреждения единиц биомассы.

Результаты и обсуждение

Микробные клетки *E. coli* К-12 обрабатывали 0,05% раствором дезинфицирующего средства «ТОТУС». Концентрация рабочего раствора дезинфицирующего средства была выбрана сублетальной, при которой имелась возможность с течением времени в процессе обработки наблюдать динамику разрушения клеток, которая регистрировалась микробиологическими, физико-химическими и электронно-микроскопическими методами. В таблице 1 представлены критерии оценки жизне-

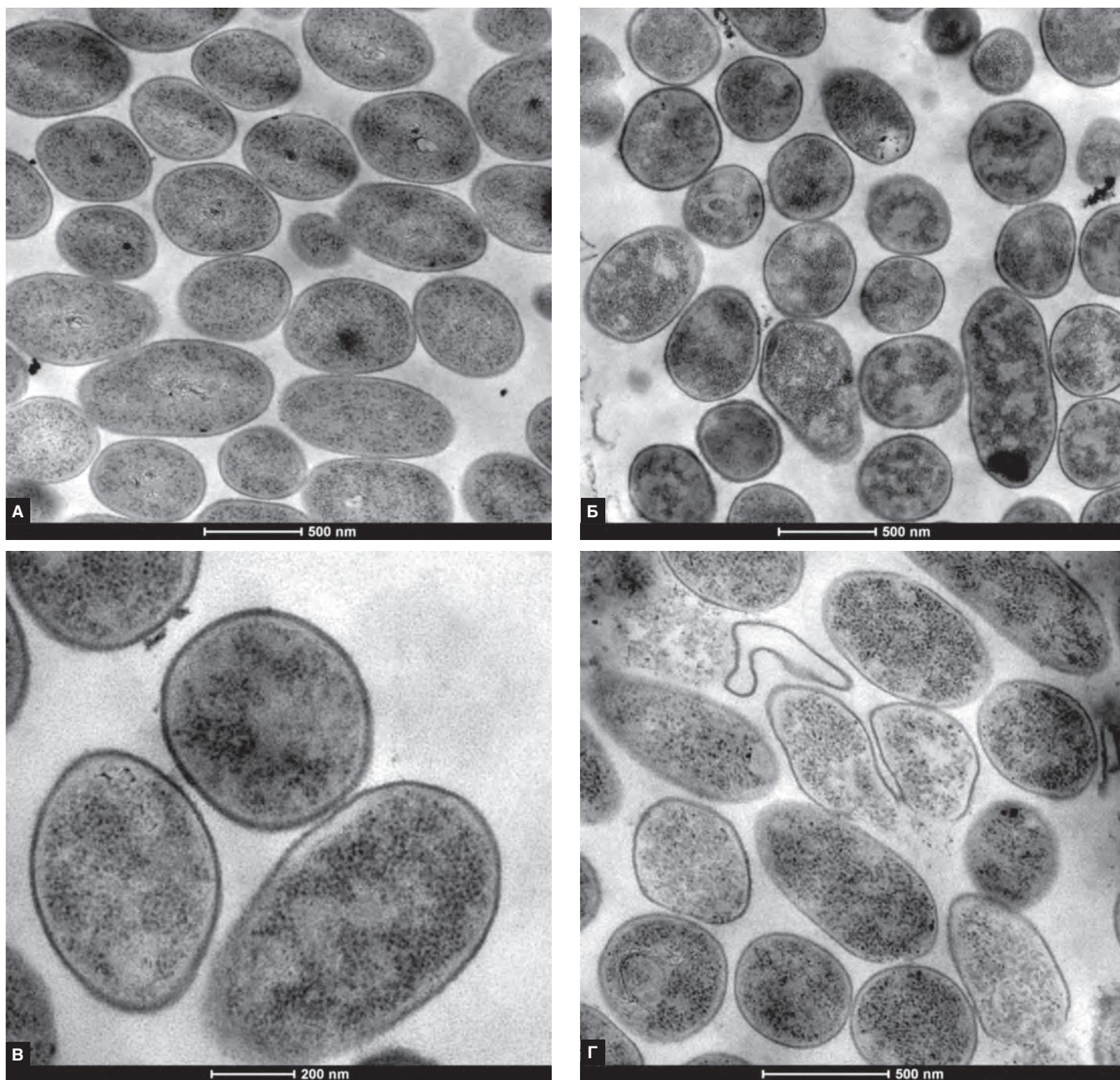


Рис. 2. Электронно-микроскопическое изображение ультратонких срезов бактерий *Escherichia coli* К-12 в просвечивающем электронном микроскопе FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN, обработанных 0,05% раствором дезинфицирующего средства «ТОТУС»: А – бактерии до контакта с дезинфектантом (контроль); Б, В – бактерии, обработанные дезинфицирующим средством в течение 15 мин; Г – бактерии, обработанные дезинфицирующим средством в течение 30 мин. Большая часть бактерий имеют необратимые структурные повреждения или разрушены.

способности бактерий, методы и методические подходы, с помощью которых изучались те или иные параметры.

Жизнеспособность биомассы микробных клеток оценивалась, прежде всего, микробиологическим методом. Титр жизнеспособных бактерий в суспензии, обработанной рабочим раствором дезинфицирующего средства, представлен в таблице 2. Полученные результаты свидетельствуют о том, что после 15 мин обработки 0,05% раствором происходит заметное изменение состояния бактерий *E. coli*. Титр культуры снижается в 5 раз и составляет $1,7 \times 10^8$ кл/см³ (титр ис-

ходной культуры $1,0 \times 10^9$ кл/см³). Полная инаktivация микроорганизмов наблюдается после 45 мин инкубации с дезинфицирующим средством.

На рисунке 1 представлена диаграмма, наглядно демонстрирующая изменение титра культуры *E. coli* в процессе обработки 0,05% раствором дезинфицирующего средства «ТОТУС».

Физико-химические исследования лизата клеток *E. coli*, обработанных 0,05% раствором средства в течение 15 мин, показали, что жидкая фракция содержала значительное

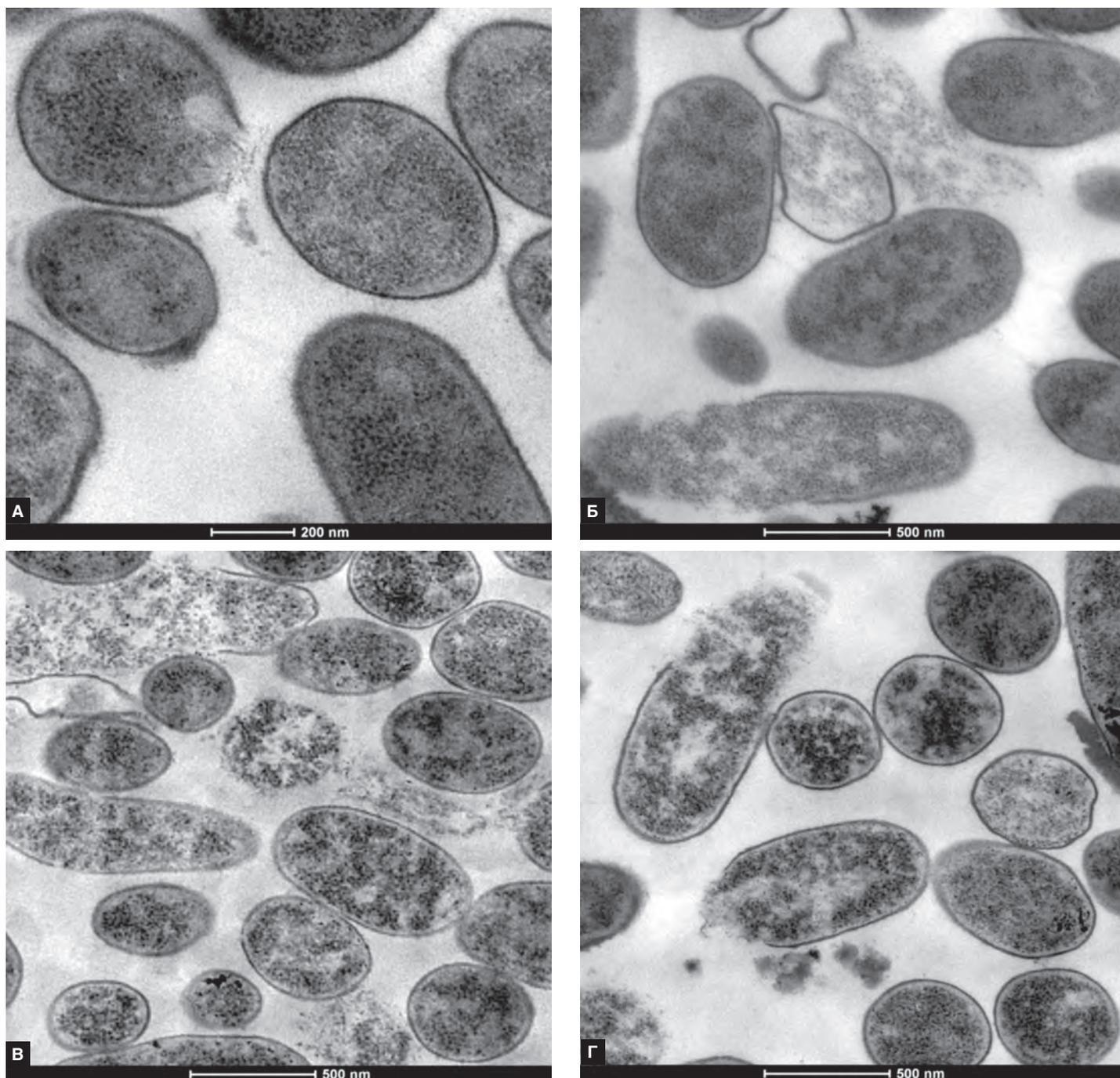


Рис. 3. Электронно-микроскопическое изображение ультратонких срезов бактерий *Escherichia coli* K-12 в просвечивающем электронном микроскопе FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN, обработанных 0,05% раствором дезинфицирующего средства «ТОТУС»: А – клетки, обработанные дезинфицирующим средством в течение 45 мин; Б – бактерии, обработанные дезинфицирующим средством в течение 60 мин; В, Г – бактериальные клетки через 120 мин воздействия дезинфицирующим средством. Все микробы на этой стадии воздействия дезинфицирующим средством повреждены или разрушены.

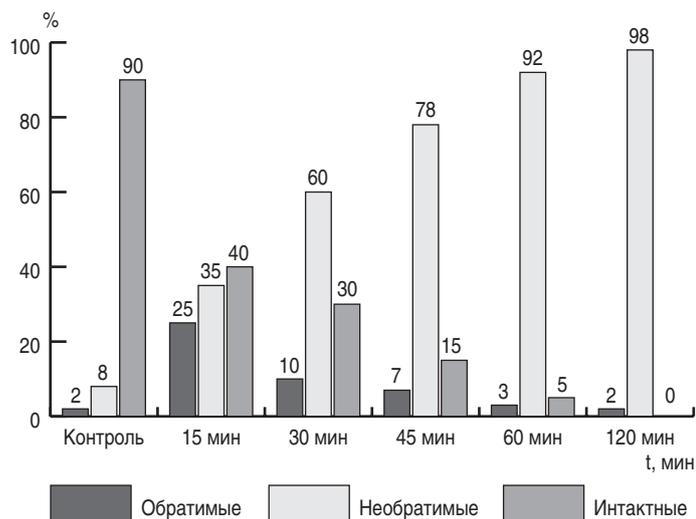


Рис. 4. Динамика изменения количества неповрежденных (интактных) и поврежденных клеток *Escherichia coli* K-12 в процессе воздействия 0,05% раствором дезинфицирующего средства «Тотус».

количество белка и ДНК. На этом этапе количество общего белка равнялось $0,36 \pm 0,03$ мг/см³ и составляло 60% от максимального содержания белка в полностью лизированной культуре (табл. 2). По результатам физико-химических исследований полный лизис клеток *E. coli* наблюдался через 60 мин после начала обработки культуры дезинфицирующим средством. Напротив, результаты посева культуры показали, что микробные клетки потеряли жизнеспособность уже к окончанию 45-минутной инкубации. Разночтение микробиологических и физико-химических результатов объясняется тем, что к окончанию 45-минутной инкубации цитоплазматическая мембрана части микроорганизмов не была разрушена, и содержимое (белки и ДНК) оставалось внутри клеток, однако при сохранении целостности мембранных структур микроорганизмы уже потеряли свою жизнеспособность.

Наглядное представление изменений, происходящих внутри клеток *E. coli*, было получено при анализе электронно-микроскопических фотографий, позволяющих наблюдать трансформацию клеток в процессе воздействия дезинфицирующего средства (рис. 2, 3).

По данным электронной микроскопии бактерии исходной (контрольной) культуры *E. coli* имели тонкую структуру, типичную для грамотрицательных бактерий: клеточная оболочка, состоящая из тонкой, слегка извилистой внешней мембраны, тонкого пептидогликанового слоя и сравнительно гладкой цитоплазматической мембраны, цитоплазмы, упакованной различными глобулярными и фибриллярными компонентами. Внутриклеточный мембранный аппарат был слабо развит.

Динамика уменьшения количества интактных клеток культуры *E. coli* после воздействия на них 0,05% раствором дезинфицирующего средства «ТОТУС» в течение времени выдержки 15–120 мин представлена на рисунке 4.

Как свидетельствуют электронно-микроскопические исследования, механизм гибели клеток *E. coli* запускался через 15 мин после начала воздействия дезинфицирующего средства. В этот момент времени количество интактных кле-

ток составляло 40% от первоначального количества, что свидетельствовало о проникновении дезинфицирующего средства через цитоплазматическую мембрану. При увеличении времени экспозиции до 30, 45, 60, 120 мин после начала обработки культуры дезинфицирующим средством количество интактных клеток продолжало снижаться и составило 30, 15, 5 и 0% соответственно. В контроле количество жизнеспособных клеток равнялось 90%.

Выводы

1. Проведена сравнительная оценка воздействия дезинфицирующего средства «ТОТУС», содержащего в качестве действующих веществ алкилдиметилбензиламмоний хлорид (5,0%) и алкилдиамин ацетат (5,5%), на *Escherichia coli* K-12 микробиологическим, физико-химическим и электронно-микроскопическим методами.

2. Определение выживаемости тест-микроорганизма микробиологическим методом показало, что гибель клеток *E. coli* K-12 достигается к окончанию 45-минутной инкубации с дезинфицирующим средством.

3. По результатам физико-химических исследований полное лизирование культуры *E. coli* K-12 происходит через 60 мин после начала воздействия дезинфицирующего средства.

4. Ультраструктурные изменения, выявленные с использованием электронно-микроскопических исследований, свидетельствовали о полном отсутствии интактных клеток *E. coli* K-12 через 120 мин времени воздействия дезинфицирующего средства.

5. В результате исследований установлено, что механизм действия дезинфицирующего средства «ТОТУС» связан с проникновением средства через цитоплазматическую мембрану.

6. Применение микробиологических, физико-химических и электронно-микроскопических исследований в области создания современных дезинфицирующих средств направлено на повышение надежности профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

Литература

- Шестопалов НВ, Шандала МГ. Молекулярно-биологические аспекты дезинфектологии: состояние и задачи углубленной разработки. Дезинфекционное дело. 2013;3:17-21.
- Федорова ЛС. Теория и практика совершенствования дезинфицирующих средств. М.: «Медицина», 2006, 216 с.
- Крученко ТБ. Перспективы развития исследований по механизму действия дезинфицирующих средств. Теория и практика дезинфекции и стерилизации. 1983, с. 8-11.
- Крученко ТБ. Научные основы направленного поиска новых дезинфицирующих средств и изучение механизма их действия. Проблемы дезинфекции и стерилизации. 1985, с. 6-13.
- Диденко ЛВ, Кардаш ГГ, Смирнова ТА, и др. Изучение механизма действия третичных алкиламинов на клинических изолятах *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Дезинфекционное дело. 2015;1:32-6.
- Самойленко ИИ, Васильева ЕИ, Павлова ИБ, Туманян МА. Механизмы бактерицидного действия перекиси водорода. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1983;12:30-3.
- Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности: Руководство Р 4.2.2643-10:

утверждено Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г.Онищенко 01.06.2010.

8. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folinphenolreagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.

References

1. Shestopalov NV, Chandala MG. Molecular biological aspects of disinfectology: state and tasks of in-depth development. *Dezinfektsionnoe delo (Disinfection Affairs)*. 2013;3:17-21. (In Russian).
2. Fedorova LS. *Teoriya i praktika soverchenstvovaniya dezinficiruyuschih sredstv [Theory and practice of perfection of disinfectants]*. Moscow: "Medicine" Publ., 2006, 216 p. (In Russian).
3. Kruchenok TB. Prospects for the development of research on the mechanism of action of disinfectants. *Teoriya i praktika desinfekcii i sterilizatsii (Theory and practice of disinfection and sterilization)*. 1983, pp. 8-11. (In Russian).
4. Kruchenok TB. Scientific bases of directed search of new disinfectants and study of the mechanism of their action. *Problemi dezinfekcii i sterilizatsii (Problems of disinfection and sterilization)*. 1985, pp. 6-13. (In Russian).
5. Didenko LV, Kardash GG, Smirnova TA, et al. Studing the action mechanism of tertiary alkylamines on clinical isolates *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Dezinfektsionnoe delo (Disinfection Affairs)*. 2015;1:32-6. (In Russian).
6. Samoilenko II, Vasileva EI, Pavlova IB, Tumanian MA. The mechanisms of bactericidal action of hydrogen peroxide. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology*. 1983;12:30-3. (In Russian).
7. Methods of laboratory research and testing of disinfectants to assess their effectiveness and safety: Guide P 4.2.2643-10: approved by the Head of Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Chief State Sanitary Doctor of Russia G.G.Onishchenko 01.06.2010. (In Russian).
8. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folinphenolreagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.

Информация об авторах:

Конев Александр Евгеньевич, генеральный директор ООО «МК ВИТА-ПУЛ»
Адрес: 125212, Москва, ул. Выборгская, 16, стр. 1
Телефон: (495) 514-1900

Роганова Наталья Борисовна, кандидат химических наук, главный химик-эксперт ООО «МК ВИТА-ПУЛ»
Адрес: 125212, Москва, ул. Выборгская, 16, стр. 1
Телефон: (495) 514-1900

Гутерман Раиса Лазаревна, кандидат медицинских наук, научный консультант ООО «МК ВИТА-ПУЛ»
Адрес: 125212, Москва, ул. Выборгская, 16, стр. 1
Телефон: (495) 514-1900

Комарова Александра Игоревна, ведущий химик-эксперт ООО «МК ВИТА-ПУЛ»
Адрес: 125212, Москва, ул. Выборгская, 16, стр. 1
Телефон: (495) 514-1900

Киселева Наталья Владимировна, ведущий инженер отдела дезинфектологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 31-2044

Быстрова Елена Владимировна, научный сотрудник отдела дезинфектологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 31-2044

Герасимова Юлия Владимировна, инженер отдела дезинфектологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 31-2044

Котов Сергей Анатольевич, инженер отдела дезинфектологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 31-2044

Храмов Михаил Владимирович, заместитель директора ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0017

Information about authors:

Aleksandr E. Konev, Managing Director of VITA-POOL MK Co., Ltd.
Address: 16/1, ul. Vyborgskaya, Moscow, 125212, Russian Federation
Phone: (495) 514-1900

Natalya B. Roganova, Ph in Chemical sciences, Senior chemist-expert of VITA-POOL MK Co., Ltd.
Address: 16/1, ul. Vyborgskaya, Moscow, 125212, Russian Federation
Phone: (495) 514-1900

Raisa L. Guterman, Ph in Medical sciences, Scientific consultant of VITA-POOL MK Co., Ltd.
Address: 16/1, ul. Vyborgskaya, Moscow, 125212, Russian Federation
Phone: (495) 514-1900

Alexandra I. Komarova, Leading chemist-expert of VITA-POOL MK Co., Ltd.
Address: 16/1, ul. Vyborgskaya, Moscow, 125212, Russian Federation
Phone: (495) 514-1900

Natalia V. Kiseleva, Leading engineer of Desinfectology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB, 142279, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2044

Elena V. Bystrova, Saentist of Desinfectology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB, 142279, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2044

Yulia V. Gerasimova, Engineer of Desinfectology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB, 142279, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2044

Sergey A. Kotov, Engineer of Desinfectology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB, 142279, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2044

Mihail V. Khramov, Ph in Medical sciences, Deputy Director State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB, 142279, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0017

Электронно-микроскопическое исследование деструктивного влияния на клетки *Escherichia coli* антимикробного вещества, синтезируемого *Bacillus lentus* B-7150

В.Д.Похиленко, В.Н.Герасимов, В.В.Перелыгин, Т.А.Калмантаев, Ю.В.Герасимова, С.А.Котов

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

Проведено электронно-микроскопическое изучение характера повреждения грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* M17 антимикробным веществом, синтезируемым антагонистически активным штаммом B-7150 *Bacillus lentus* в условиях *in vitro*. Выявлены особенности в морфологических проявлениях взаимодействия указанного вещества с микробной клеткой кишечной палочки. Антимикробное вещество (AMB) в агрегированном состоянии под электронным микроскопом представляло собой длинные неоднородные нити размером около 8×10000 нм. Показано, что через 30 мин совместной инкубации бактерий кишечной палочки с AMB на препаратах ультратонких срезов обнаруживались клетки с разрушенной внешней мембраной. Высевы на питательную среду необработанной и обработанной AMB бактериальной суспензии в концентрации 1 млрд клеток/мл показали сплошной рост и его полное отсутствие на чашках соответственно. Делается вывод о мембранотропном характере действия AMB *B. lentus* на грамотрицательные бактерии.

Ключевые слова: антимикробное вещество, *Bacillus lentus*, *Escherichia coli*, электронная микроскопия

Для цитирования: Похиленко В.Д., Герасимов В.Н., Перелыгин В.В., Калмантаев Т.А., Герасимова Ю.В., Котов С.А. Электронно-микроскопическое исследование деструктивного влияния на клетки *Escherichia coli* антимикробного вещества, синтезируемого *Bacillus lentus* B-7150. Бактериология. 2017; 2(2): 66–70. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-66-70

Electron microscopic study of the destructive effect of antimicrobial substances synthesized by *Bacillus lentus* B-7150 on *Escherichia coli* cells

V.D.Pokhilenko, V.N.Gerasimov, V.V.Pereygin, T.A.Kalmantaev, Yu.V.Gerasimova, S.A.Kotov

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

Electron microscopic study of *Escherichia coli* M17 damage by antimicrobial substance synthesized by antagonistically active strain of *Bacillus lentus* B-7150 *in vitro* has been done. Specific morphological features of the interaction of this substance with the microbial cells of *Escherichia coli* are revealed. The antimicrobial substance (AMB) in the aggregated state under the electron microscope had the form of long non-uniform filaments about $8 \times 10,000$ nm in size. It was shown that after 30 min of joint incubation of *E. coli* bacteria with AMB cells with a destroyed outer membrane were detected on the preparations of ultrathin sections. After the bacterial suspension was sown at a concentration of 1 billion cells / ml on Petri dishes in the presence of AMB, complete absence of growth was observed. The conclusion has been made about membranotropic action of the AMB *B. lentus* on gram-negative bacteria.

Keywords: antimicrobial agent, *Bacillus lentus*, *Escherichia coli*, electron microscopy

For citation: Pokhilenko V.D., Gerasimov V.N., Pereygin V.V., Kalantaev T.A., Gerasimova Yu.V., Kotov S.A. Electron microscopic study of the destructive effect of antimicrobial substances synthesized by *Bacillus lentus* B-7150 on *Escherichia coli* cells. Bacteriology. 2017; 2(2): 66–70. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-66-70

В связи с резким обострением проблемы возрастания антибиотикорезистентности циркулирующих в природе штаммов возбудителей многих заболеваний бактериальной природы не утихает интерес к поиску и применению в лечеб-

ной практике и пищевой промышленности новых антимикробных биогенных, отличающихся от традиционных антибиотиков. Это относится и к грамотрицательным бактериям кишечной группы – возбудителям пищевых токсикоинфекций рода *Esche-*

Для корреспонденции:

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

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-0027

E-mail: pokhilenko@obolensk.org

Статья поступила 23.11.2016 г., принята к печати 30.06.2017 г.

For correspondence:

Victor D. Pokhilenko, Dr. Sc (Tech), leading researcher of Department of biological technologies State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0027

E-mail: pokhilenko@obolensk.org

The article was received 23.11.2016, accepted for publication 30.06.2017

richia, *Salmonella*, *Yersinia* и *Shigella*. Вспышки иерсиниоза и колибактериоза нередко связаны с употреблением овощных салатов, фруктов, плодово-ягодных напитков. Например, в массовом заражении от употребления овощной продукции в 2011 г. в Европе, когда пострадали более 50 человек, оказалась повинна кишечная палочка штамма O104:H4. Эта инфекция была сопряжена с проявлением гемолитико-уремического синдрома, чреватого острой почечной недостаточностью, поражением центральной нервной системы [1]. Для отработки схем и методов воздействия на бактериальные возбудители кишечных заболеваний с помощью новых антимикробных веществ природного происхождения, синтезируемых непатогенными штаммами бацилл, необходимо проведение комплекса работ. Среди них значительный интерес представляют исследования, направленные на визуализацию антимикробного эффекта на клетки.

Целью данной работы являлось электронно-микроскопическое исследование характера действия антимикробного вещества *B. lentus* на клетки кишечной палочки.

Материалы и методы

В работе использовали бактериальные штаммы *E. coli* M17 и *B. lentus* B-7150, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk». Культуры бактерий выращивали на плотной питательной среде ГРМ-агар (ГНЦ ПМБ, Россия) в течение 1 сут при температуре 37°C и 2 сут при 29–30°C для *E. coli* и *B. lentus* соответственно. Антимикробное вещество (АМВ) было получено в сухом виде из штамма *B. lentus* B-7150 по ранее разработанной методике [2]. Препарат АМВ отличается преимущественным действием на широкий спектр грамотрицательных бактерий (исключая *Pseudomonas*), устойчивостью

к нагреву до 120°C в течение 15 мин, разрушается при сочетанном действии щелочной среды (pH 10) и автоклавирования (120°C, 20 мин), имеет молекулярную массу по данным SDS PAGE около 4–5 кДа [3].

Для проведения электронно-микроскопических исследований готовили взвесь клеток *E. coli* M17 в 5 мл физраствора (концентрация 1×10^9 /мл), используя отраслевой стандарт мутности ГИСК им. Л.И. Тарасевича. Клеточную суспензию по 2 мл вносили в два стеклянных флакона – контрольный и опытный. В опытный флакон добавляли 30 мг сухого порошка АМВ *B. lentus* и перемешивали. Пробы отбирали через 10 мин в течение получаса. Пробы из контрольного и опытного флаконов высевали на ГРМ-агар в чашках Петри и культивировали при температуре 37°C в течение 20 ч. Оставшуюся во флаконах суспензию фиксировали в течение 1 ч при комнатной температуре 2,5% раствором глутарового альдегида («Serva», Германия) на 0,05M какодилатном буфере (pH 7,2).

Для визуализации морфологии целых клеток в просвечивающем электронном микроскопе часть суспензии бактерий препарировали методом негативного контрастирования. Для этого суспензию клеток наносили на медные сеточки, покрытые формваровой пленкой, и контрастировали 1% раствором уранилацетата. Негативно окрашенные образцы просматривали в электронном микроскопе Hitachi H-300 (Япония) при ускоряющем напряжении 75 кВ и 5000–25 000-кратном увеличении.

Для визуализации повреждений структурных элементов бактерий на субмикроскопическом уровне другую суспензию бактерий препарировали методом ультратонких срезов. Для этого клеточную суспензию дополнительно фиксировали 1% раствором четырехокси осмия на буфере Райтер-Келенбергер (pH 6,0) в течение 18 ч при 8°C. Затем образцы дегидратировали в этиловом спирте и заключали в смесь аралдитов. Ультратонкие срезы бактерий получали на ультрамикро-

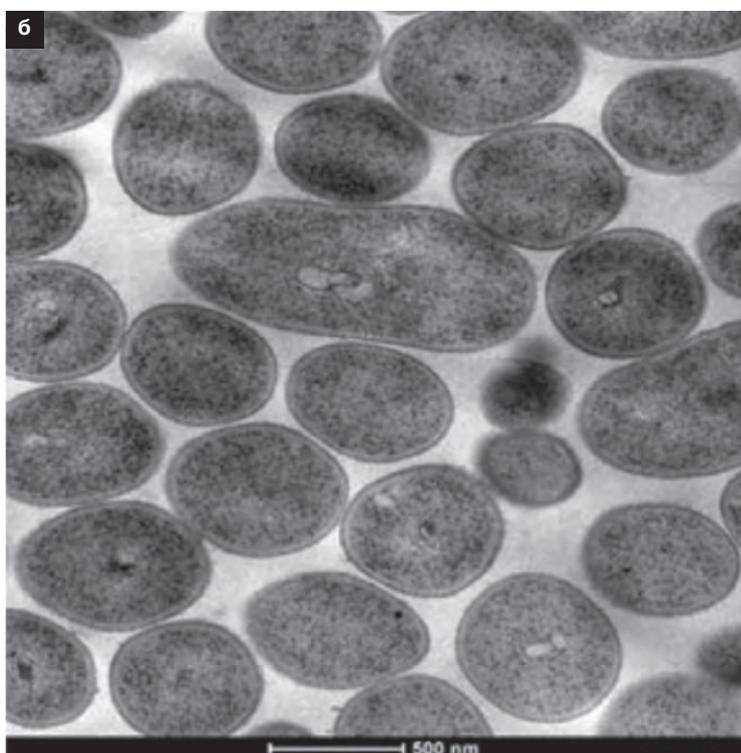


Рис. 1. Электронно-микроскопическая картина нативных клеток *E. coli* M17: а – целые клетки; б – срезы клеток.

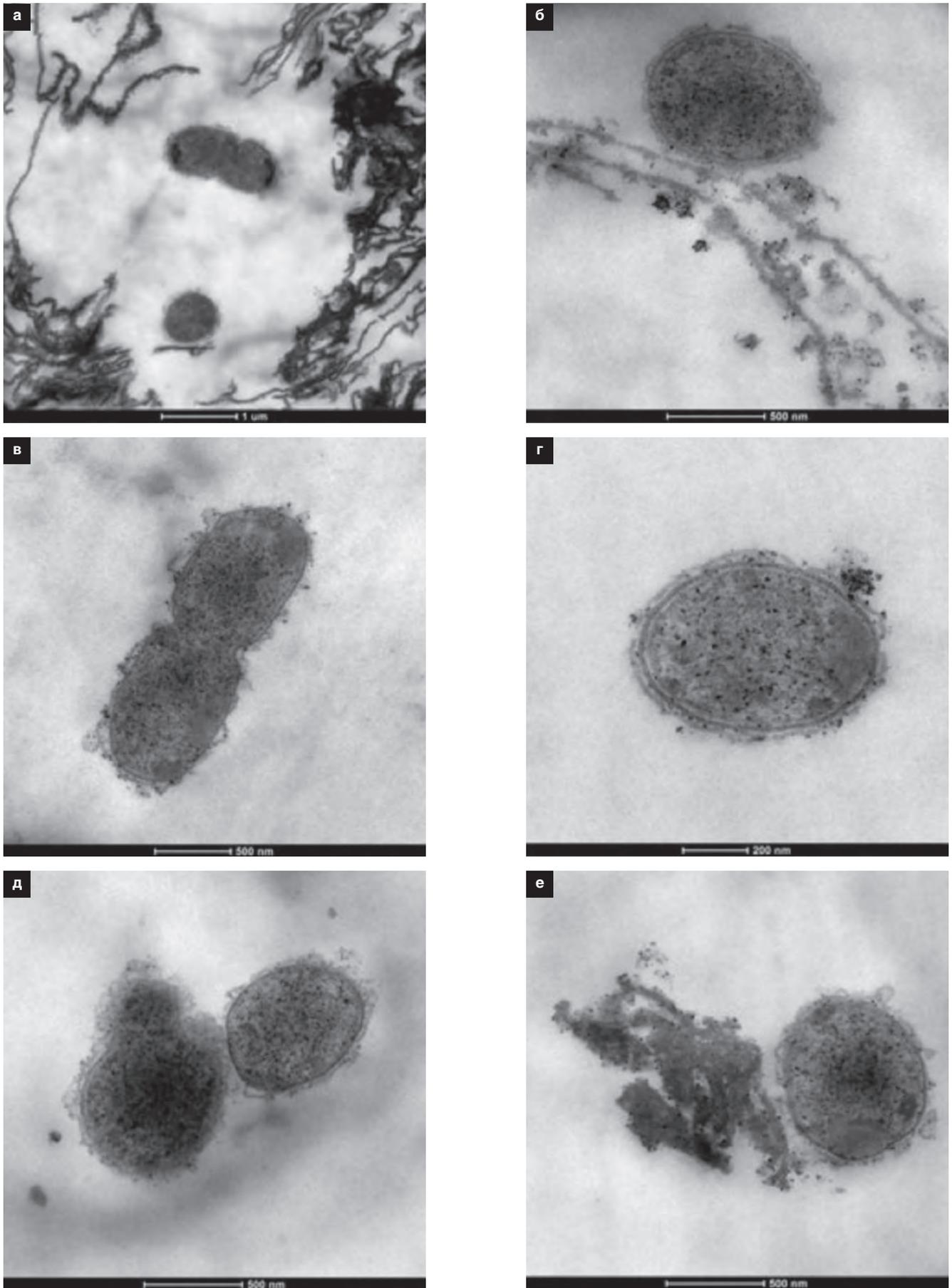


Рис. 2. Электронно-микроскопическая картина действия клеток AMB *B. lentus* на клетки *E. coli* M17: клетки в окружении AMB (а, б); стадии разрыхления цитоплазматической мембраны (в, г) и разрушения (д, е).

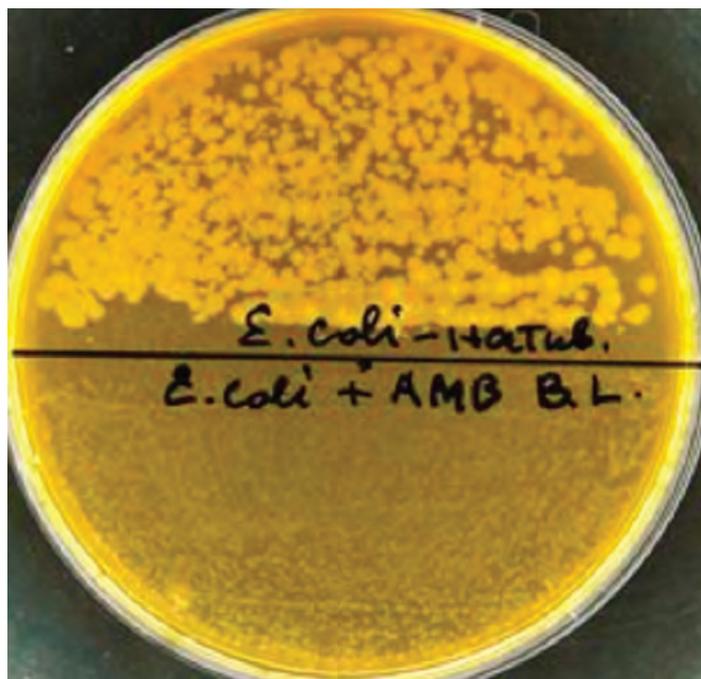


Рис. 3. Результат посева нативной суспензии *E. coli* M17 и обработанной AMB *B. lentus*.

томе Ultracut (фирма «Reichert Jung», Австрия). Срезы дополнительно контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Препараты ультратонких срезов после контрастирования просматривали в электронном микроскопе FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN (CIF) при ускоряющем напряжении 160 кВ. Фотографирование проводили на электронных носителях с помощью камеры Keen View («Olympus», Германия).

Результаты и обсуждение

Как показали результаты исследования образцов бактерий в просвечивающем электронном микроскопе, негативно окрашенные клетки штамма кишечной палочки имеют размер около $0,5 \times 1,5$ мкм и до воздействия AMB имели гладкую поверхность и целостную оболочку (рис. 1). На электрограмме ультратонких срезов клеток (рис. 1 б) различаются непрерывная, слегка извилистая внешняя мембрана, узкий пептидогликановый слой, сравнительно ровная трехслойная цитоплазматическая мембрана. Цитоплазма нативных клеток имела непрерывную консистенцию с диффузными включениями рибосом, полисом, нитей хроматина и других ультраструктур.

Молекулы AMB *B. lentus* (далее AMB-BL) в силу их амфифильности способны объединяться в агрегаты – их водные растворы при хранении становились слабо опалесцирующими. Впервые показано, что AMB-BL имеют вид длинных неоднородных нитей (тяжей) размером около $8 \times 10\,000$ нм, способных сворачиваться (рис. 2).

Было установлено, что под воздействием AMB-BL происходит нарушение структурной целостности оболочечного комплекса кишечной палочки (рис. 2 в, г, д, е). Это проявляется в разрыхлении и разрыве внешней и цитоплазматической мембран, локальных повреждениях пептидогликанового слоя, в структурных изменениях цитоплазмы с последующим вытеканием клеточного содержимого.

Эти наблюдения подтверждаются данными бактериологических исследований: бактерии *E. coli*, обработанные AMB, полностью погибают уже после 10 мин инкубации. В посевах из экспериментальной пробы с 15 мг/мл AMB, в отличие от контрольной (верхняя часть чашки), рост кишечной палочки полностью отсутствует (рис. 3, нижняя часть чашки).

Таким образом, было установлено, что под действием антимикробного вещества, продуцируемого штаммом B-7150, *B. lentus* в клетках кишечной палочки происходят морфологические изменения, сопровождающиеся их гибелью. По-видимому, AMB обладает мембранотропным действием на бактериальные клетки, не давая им никакого шанса на выживание.

Литература

1. Кафтырева ЛА, Егорова СА, Макарова МА, Забровская АВ, Матвеева ЗН, Сужаева ЛВ, и др. Характеристика биологических свойств *E. coli* O104:H4 – возбудителя крупной пищевой вспышки, возникшей в Германии в мае 2011 г. Клиническая лабораторная диагностика. 2012;1:44-7.
2. Калмантаев ТА, Садикова ГТ, Перельгин ВВ, Похиленко ВД. Бактериоциноподобное вещество *Bacillus circulans* и способ его получения. Вестник Томского государственного университета. Биология. 2012;2(18):52-65.
3. Похиленко ВД, Перельгин ВВ, Садикова ГТ, Лунева НИ, Мицевич ИП. Штамм *Bacillus lentus* – продуцент бактериоциноподобной субстанции антимикробного действия и способ получения бактериоциноподобной субстанции. Патент России №2530552, 2014. Бюл. №30.

References

1. Kafytyryeva LA, Yegorova SA, Makarova MA, Zabrovskaya AV, Matveyeva ZN, Sujayeva LV, et al. The characteristics of biological properties of *E. coli* O104:H4 – the causative agent of large-scale alimentary ictus in Germany May 2001. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2012;1:44-7. (In Russian).
2. Kalmantaev TA, Sadikova GT, Perelygin VV, Pokhilenko VD. Bacteriocin-like substance *Bacillus circulans* and way of its production. Vestnik Tomskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Biologiya (Tomsk State University Journal of Biology). 2012;2(18):52-65. (In Russian).
3. Pokhilenko VD, Perelygin VV, Sadikova GT, Luneva NI, Mitsevich IP. Shtamm *Bacillus lentus* – produtsent bakteriotsinopodobnoi substantsii antimikrobnogo deistviya i sposob polucheniya bakteriotsinopodobnoi substantsii. The Patent Of Russia №2530552, 2014. Bull. No. 30. (In Russian).

Информация о авторах:

Герасимов Владимир Николаевич, доктор биологических наук, заведующий отделом дезинфектологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 31-2044
E-mail: ilcvngerasimov@obolensk.org

Перельгин Владимир Владимирович, кандидат биологических наук, заведующий отделом биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0027

Калмантаев Тимур Ахмерович, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0027

Герасимова Юлия Владимировна, инженер отдела дезинфектологии
ФБУН «Государственный научный центр прикладной
микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk,
ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 31-2044

Котов Сергей Анатольевич, инженер отдела дезинфектологии
ФБУН «Государственный научный центр прикладной
микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk,
ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 31-2044

Information about authors:

Vladimir N. Gerasimov, Dr. Sc (Biol), Head of Department of desinfectology
State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region,
Russian Federation
Phone: (4967) 31-2044
E-mail: ilcvngerasimov@obolensk.org

Vladimir V. Perelygin, PhD, Head of Department of biological technologies
State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region,
Russian Federation
Phone: (4967) 36-0027

Timur A. Kalmantaev, PhD, Researcher of Department of biological technologies
State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region,
Russian Federation
Phone: (4967) 36-0027

Yuliya V. Gerasimova, engineer of Department of desinfectology
State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region,
Russian Federation
Phone: (4967) 31-2044

Sergey A. Kotov, engineer of Department of desinfectology
State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region,
Russian Federation
Phone: (4967) 31-2044

НОВЫЕ КНИГИ

Microbes from Hell

by Patrick Forterre and Teresa Lavender Fagan

ISBN-13: 9780226265827

ISBN-10: 022626582X

Publisher: University of Chicago Press

Publish Date: October 2016

Page Count: 288

В книге «Микробы из Ада» один из ведущих экспертов по археям и гипертермофилам предлагает увлекательное таксономическое путешествие. Рассказ о поиске термофилов сочетается с обсуждением всех их физиологических особенностей и превратностей на пути их адаптации к условиям высоких температур. Автор показывает путь, который пришлось пройти, чтобы понять взаимоотношения между археями и остальными организмами планеты Земля: от биотехнологии до последних открытий в области изучения термофильных микроорганизмов, от микробиомов до сообществ микроорганизмов, населяющих глубоководные жерла.

Yersinia Pestis: Петроспектива и перспектива

by Ruifu Yang and Andrey Anisimov

ISBN-13: 9789402408881

ISBN-10: 9402408886

Publisher: Springer

Publish Date: October 2016

Page Count: 391

Книга касается практически каждого аспекта *Y. pestis*. Рассмотрены вопросы истории, эпидемиологии, физиологии, экологии, геномных исследований, эволюции, патогенеза и взаимодействия «хозяин-патоген». Обсуждаются вопросы разработки вакцин, клинические аспекты и будущие направления исследований. На протяжении веков ученые пытались определить, откуда появилась *Y. pestis*, одна из самых известных бактерий, ставшая причиной ряда эпидемий и гибели множества людей на протяжении всей истории человечества; что это такое и как она вызывает болезнь. Книга дает ответы, предлагая новейшие результаты исследований. Книга не только об истории чумы, но и о влиянии чумы на цивилизацию в целом. В книге рассмотрены вопросы, касающиеся взаимоотношений возбудителя с хозяином, с векторами и окружающей средой, что позволяет лучше понять процесс его эволюции и патогенез. Книга может стать незаменимой для исследователей и аспирантов, изучающих *Y. pestis*. Она также неопределима для ученых, занятых в других областях, таких как инфекционные болезни, изучение возбудителей, а также для системных биологов, благодаря выводам, сделанным в книге по изучению возбудителей бактериальных инфекций.

О работе 7-го конгресса европейских микробиологов (FEMS 2017) 9–13 июля 2017 г., г. Валенсия (Испания)

В работе 7-го Конгресса европейских микробиологов (FEMS 2017) приняли участие 2686 делегатов из 85 стран. Было представлено около 3000 докладов (включая постерные доклады).

Сформированное не так давно понятие «резистом» (совокупность генов устойчивости к антибиотикам – «resistome») послужило основой для формирования одного из симпозиумов с соответствующим названием. К новым технологиям изучения резистома были отнесены метагеномные исследования содержимого кишечника и высокопроизводительная ПЦР, что позволило выявить у здоровых людей и госпитализированных пациентов большое количество видов микроорганизмов, в том числе и непатогенных, несущих гены устойчивости к антибиотикам. Показано, что резистом является очень динамичным под влиянием лечения антибиотиками, и что бактерии-комменсалы, такие как *Bacteroidetes* и *Clostridium*, являются главными резервуарами генов устойчивости к антибиотикам в кишечнике человека (W. van Schaik, UK). Широко обсуждались вопросы попадания в окружающую среду патогенов, несущих гены антибиотикорезистентности, их адаптации и взаимодействия с сапрофитами и простейшими, роль в этом процессе плазмид резистентности (J. Holden UK). В этой же связи описаны механизмы немутационной устойчивости патогенных микроорганизмов к антибиотикам, когда благодаря фенотипической гетерогенности клетки могут реализовывать механизмы устойчивости, не связанные с ДНК, а именно, уменьшение синтеза поринов, активное выделение антибиотика из клетки и др. (J. Casadesus, Spain). Исследование фазовых вариаций в популяциях патогенных бактерий показало, что не всегда по структурным генам ЛПС может быть осуществлена идентификация сероварианта, что связано с эпигенетическим регулированием, например, у сальмонелл, и может влиять на диагностику, эволюцию серовариантов, взаимодействие патоген-хозяин и обеспечивать иммунологическую мимикрию (M. Van der Woude, UK). Исследование гетерогенности популяций бактерий показало, что может иметь место специализация различных клоновых групп при переживании неблагоприятных условий, например, при воздействии антибиотиками. Обсуждаются вопросы, как исследования индивидуальных бактерий и совместной вирулентности групп бактерий могут потенциально привести к разработке новых способов управления инфекциями (M. Ackermann, Switzerland).

В симпозиуме «Коммуникация клетка–клетки, передача сигналов и ощущение кворума» на примере *Pseudomonas aeruginosa* показано, что экспрессия многих факторов виру-

лентности и генов образования биопленки регулируется на транскрипционном уровне с глобальными регулирующими системами, включая чувство кворума (QS). Последний определяет межклеточную коммуникационную сеть, которая объединяет информацию на уровне популяции, координируя метаболический статус клеток. QS зависит от синтеза сигнальных молекул, которые позволяют патогенным микроорганизмам синхронизировать свое поведение.

QS – потенциальная антибактериальная мишень у патогенов, где штаммы, несущие мутации в ключевых генах QS, имеют значительно меньшую патогенность в моделях инфекции животных. В дальнейшем необходимо выявлять системы QS, являющиеся активными во время инфекций у человека при клинических исследованиях, где молекулы сигнала QS могут быть обнаружены в образцах проб от пациента.

Так как QS по определению зависит от взаимодействий небольших молекул лиганд-рецептор, то это может являться одним из фармакологических направлений создания ингибитора, в силу того, что стерические требования для оптимальных взаимодействий лиганда/рецептора говорят о том, что антагонисты могут быть получены посредством структурной модификации нативных молекул (P. Williams, United Kingdom).

Приведены данные о возможности активации или ингибирования механизмов реализации популяцией QS и координации образования биопленки на модели стрептококков, а также о выявлении данных механизмов транскрипционной регуляции у лактобацилл, листерий и энтерококков (R. Gardan, France).

В симпозиуме «Микробиом патоген-хозяин: трехстороннее взаимодействие хозяин-патоген при микробных инфекциях» представлена разработанная модель для изучения кишечных инфекций на основе использования безмикробных мышей и 12 выбранных штаммов, колонизирующих их кишечник. Использован «Meta-omics» анализ, позволяющий чрезвычайно расширить наши знания о метаболическом разнообразии микробиоты кишечника и ее ассоциации с болезнями человека. Однако остается проблемой анализ функций и количественное воздействие отдельных компонентов микробиоты (B. Stecher, Germany). В докладе «Микробиом и инфекция, вызванная *Clostridium Difficile*», описан новый технологический процесс, основанный на целевом фенотипичном культивировании, связанном с крупномасштабным полногеномным секвенированием, филогенетическим анализом и вычислительным моделированием, которое продемонстрировало, что существенное количество кишечных бактерий могут быть культивированы (H. Browne et al., United Kingdom).

При исследовании 6-го типа секреции у шигелл и микробиома кишечника были охарактеризованы две системы, которые обеспечивают колонизацию слизистой оболочки толстого кишечника *S. sonnei*: секреторная система типа 6 и колицин, которые уникальны для этого серотипа и важны для того, чтобы занять нишу вместе с таким комменсалом, как *Escherichia coli*. Кроме того, *S. sonnei* показали высокую способность вытеснять *S. flexneri*, в опытах как *in vitro*, так и *in vivo*, что, возможно, объясняет частое появление *S. sonnei* среди различных серотипов шигелл, которые вызывают бактериальную дизентерию (P.Sansonetti, France).

Несколько докладов было связано с областью синтетической микробиологии, которая позволяет создавать искусственные биологические системы с заранее заданными свойствами. В настоящее время активно создаются информационные базы синтеза отдельных компонентов клетки, разрабатываются новые методы для обнаружения и анализа кластеров генов, биосинтеза и моделирования работы отдельных систем клетки. Созданы общие информационные базы данных по синтетической биологии, разработан механизм ортогональной транскрипции, основанный на молекулярных сигналах компартаментов клетки, разработаны методы выявления и анализа кластеров генов вторичных метаболитов (E.Takano, UK). Показаны достижения в области контролируемой синтетической транскрипции белков, установлено, что большое влияние оказывают правильно подобранные условия процесса (K.Jung, Germany).

На симпозиуме, посвященном биопленкам, их формированию и обеспечению персистенции микробов, было продемонстрировано современное состояние разработок в этой области. Так, несмотря на большое количество литературы по идентификации биопленок, никакие антибактериальные препараты в клинической практике не способны эффективно лечить инфекционные болезни, вызванные биопленкообразующими бактериями. Усилия должны быть сконцентрированы на усилении действия современных антибиотиков в их комбинациях для преодоления эффекта биопленки. Необходимы знания о профиле резистентности штаммов, образующих биопленку, путем исследования планктонных бактерий, а также выработка новых стратегий лечения, позволяющих полностью уничтожить популяцию клеток в биопленке (S.Haeussler, Germany). Показана роль физиологической адаптации в резистентности и вирулентности бактерий в биопленке, в частности, на примере *Burkholderia cenocepacia* и *Staphylococcus aureus*, установлено изменение физиологии клеток и метаболизма при образовании биопленки из разных видов бактерий и роль в этом процессе малых некодирующих РНК и мини-белков (Т.Соенуе, Belgium). Был также освещен вопрос, связанный с физиологией бактериальных персисторов, показано, что уже установлены гены, обеспечивающие данную функцию клеток и их количество, влияющее на число персисторов в бактериальной популяции, однако гораздо меньше известно о физиологии данных типов клеток, например, о их ростовых факторах. Обсуждены вопросы физиологии персисторов для понимания механизмов выживания под давлением антибиотиков (M.P.Brynildsen, USA).

Была также представлена работа по идентификации генов при адаптивном развитии бактериальной биопленки.

В частности, при использовании геномных подходов исследовано генетическое разнообразие, имеющееся во время формирования биопленки у *Streptococcus pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*. Эти исследования показали, что биопленки оказывают сильное влияние на селекцию определенных мутаций, обеспечивающих новые функции генов, отвечающих за развитие биопленки (J.Webb, United Kingdom).

На симпозиуме, посвященном таксономии некультивируемых микроорганизмов, были представлены работы, посвященные перспективам и проблемам построения классификации на основании сведений о строении генома. Показана возможность построения филогенетической классификации на основании исследования генома, в частности, при отсутствии настоящих имен у видов некультивируемых форм. На основе геномного секвенирования этим бактериям были присвоены идентификационные номера (Life Identification Numbers, LINS). На основе этого были созданы LIN-базы, с помощью которых идентифицируется или определяются подобные микроорганизмы. LIN-база обладает интуитивным интерфейсом, позволяющим описать любую группу связанных организмов, используя любой вид метаданных, и дает возможность обозначать эти группы, присваивая им цифры, если они представляют разновидность или, в случае некультивируемых организмов, какое-либо имя (T.Long, USA). Было также показано, что, несмотря на десятилетия работы микробиологов, большинство микроорганизмов являются некультивируемыми, и эта так называемая «темная материя» значительно увеличивается с развитием методов выявления микробов. Последовательности геномов штаммов, полученных из экологических и клинических источников, показали, что культивируемыми являются только около 15% бактерий из всего микробного разнообразия. Авторами использовано построение геномной классификации культивируемых форм для калибровки таксономического разнообразия микробной «темной материи» (P.Hugenholtz, Australia). Обсуждался также вопрос о принципиальной возможности построения в настоящее время универсальной таксономической модели, которая отвечала бы потребностям широкого научного сообщества, учитывая, что стали доступны различные данные о штаммах на основе MS MALDI-TOF в тандеме с секвенированием 16S РНК гена, данные о полногеномном сиквенсе, данные о фенотипе и т.п. (R.Rossello-Mora, Spain). Также было представлено мнение о том, что на основе знаний о полной структуре генома сложно построить таксономическую классификацию *Archaea* и *Bacteria* и обсуждены отношения между фенотипическими и геномными данными относительно филогенетической классификации. Некоторые исследователи считают, что идея микробного дерева жизни и иерархическая классификация не могут быть реализованы в силу высокой распространенности горизонтального переноса генов. Решением проблемы может быть развитие таких проектов, как Геномная Энциклопедия *Archaea* и *Bacteria* (GEBA) и Одна Тысяча Микробных Геномов (KMG) (M.Göker, Germany).

На симпозиуме, посвященном выживанию и персистенции были представлены данные о роли поверхностных нитчатых структур клетки в устойчивости к антибиотикам, противостоянию фагоцитозу, поглощению протистами и во взаимоотношениях паразит-хозяин, когда подавление одного из механизмов синтеза данных структур (FtsZ SulA) при-

водит к обратимому снижению вирулентности и инвазивности (M.Vicente, Spain). При исследовании посттранскрипционных путей регуляции у *Legionella pneumophila* были определены основные механизмы, способствующие выживанию возбудителя во внешней среде и внутри макрофагов. Ключевым регулятором процессов адаптации является связывающий белок РНК CsrA, и настоящие исследования привели к открытию нового способа действия CsrA, который независимо позволяет регулировать гены, находящиеся в том же самом опероне (C.Buchrieser, Belgium).

В разделе, посвященном микробиологии пищевых продуктов, обсуждались вопросы о роли антимикробных пептидов в борьбе с резистентностью к антибиотикам и проблема лечения ряда соматических заболеваний с помощью подобранных на основе исследований микробиома коктейлей из пробиотических штаммов (D.Ramon, Spain). Также обсуждалась роль используемых в животноводстве антибиотиков при развитии спектра антибиотикорезистентности у эшерихий и сальмонелл, возможные пути контроля за устойчивыми клонами, меры по предотвращению их распространения и уменьшению использования антибиотиков в сельском хозяйстве (L.Peixe, Portugal). Были представлены генетические механизмы резистентности клеток в бактериоцину, полученному из лактококков (Lcn972), который ингибирует формирование перегородки у делящихся клеток, обладает определенным спектром активности в отношении разных бактерий и является перспективным как антибактериальное средство (S.Escobedo, Norway).

Использование пробиотического штамма *Bifidobacterium longum* IPLA20022 позволило уменьшить цитотоксический эффект штамма LMG21717 *Clostridium difficile*, несущего токсины А и В типов, в монослое клеток кишечника HT29, что дает возможность рассчитывать на терапевтическое применение данного пробиотического штамма или его метаболитов (L.Valdés-Varela, Spain).

В рамках вакцинной тематики сообщено о создании новой туберкулезной вакцины MTBVAC – новая живая вакцина против туберкулеза, основанная на генетически аттенуированном мутанте *phoP-fadD26-deletion M. tuberculosis*. Две устойчивые мутации удаления в двух независимых генах вирулентности нивелируют риск возвращения к патогенности штамма. MTBVAC показал сопоставимую с BCG или превосходящую ее безопасность и иммуногенность в различных доклинических исследованиях на моделях животных, включая модель новорожденной мыши. Первое клиническое испытание вакцины на людях было недавно закончено в Швейцарии и показало хорошие результаты, это первая вакцина против туберкулеза, которая будет широко испытана в клинических исследованиях и будет предназначена для новорожденных, подростков и взрослых людей с целью усилить действенность вакцинопрофилактики туберкулеза в неблагополучных странах (M.Carlos, Spain). Об этой же вакцине шла речь и в другом докладе, где указано, что вакцина MTBVAC находится в клинических испытаниях на фазе Ib и она основана на 4-м, евроамериканском типе штаммов. Ведутся работы по изучению протективности сконструированных аналогичных по делециям штаммов типов 2 (азиатский) и 3 (африканско-индийский) (I.Perez Spain). Один из докладов был посвящен проблеме дифференциальной диа-

гностики между вакцинированными животными и зараженными диким штаммом бруцелл, так как серологические тесты обнаруживают антитела против О-цепи ЛПС бруцелл, присутствующие и у вакцинированных, и у зараженных. Была предложена методология решения данной проблемы с использованием двух связанных серологических тестов – агглютинации и iELISA (E. Martínez-Gómez, Spain).

На симпозиуме, посвященном новым подходам к использованию антибиотиков, был представлен доклад о новых антибактериальных препаратах против грамотрицательных бактерий. В частности, речь шла о синтезированных на рибосомах посттрансляционно модифицированных пептидах – лантибиотиках. Были предложены два подхода для создания на их основе новых антибактериальных препаратов – биомодулей для получения различных типов циклических и гетероциклических модификаций лантибиотиков, а также применение веществ, действующих на внешнюю мембрану для потенцирования действия лантибиотиков против бактерий (O.Kuipers, Spain). Для уничтожения персистеров, нечувствительных к антибиотикам, был предложен способ, основанный на комбинационном воздействии на клетку. Выяснено, что у персистеров, например, среди стафилококков и эшерихий, наблюдается низкий уровень АТФ, что приводит к невосприимчивости мишеней к антибиотикам (например, ферментов синтеза пептидогликана). Было использовано несколько подходов для уничтожения персистеров без участия АТФ, заключающихся в использовании ряда ферментов аутолиза клеток, воздействии лассомицина, выделенного из некультивируемых бактерий, применении пульс-дозирования антибиотика и антибактериального препарата тейксобактина, к которому нет резистентности у бактериальных клеток. Обсуждены возможные пути элиминации персистеров (K.Lewis, USA).

В разделе системной микробиологии рассматривались вопросы, относящиеся к теории развития генома микроорганизмов. Показано, что развитие генома бактерий и археобактерий является очень динамичным вследствие горизонтального переноса генов и утраты генов. По данным секвенирования было показано, что у микроорганизмов содержится более 10% «ORFans», т.е. генов, для которых не обнаруживаются гомологий у других видов, а всего в глобальном масштабе, по предварительным оценкам, может содержаться до одного миллиарда различных генов (E.V.Koonin, USA). Кроме того, были представлены данные о метагеномике и системной микробиологии, когда исследуются экосистемы от содержимого кишечника до океана. Поскольку большинство микробов кишечника происходят из окружающей среды, крайне важно изучать биологическую вариативность и взаимодействие микробов в мировом масштабе. Возможность реализации такого глобального подхода проиллюстрирована в рамках проекта TARA, когда рассматривается обширная экосистема океанов при изучении около 35 000 планктонных образцов (P.Bork, Germany).

На симпозиуме, посвященном бактериальной персистенции и токсинам-антитоксинам, представлены работы по множественной лекарственной устойчивости бактерий, когда персистеры уклоняются от действия антибиотиков благодаря замедленным физиологическим процессам в клетках. Показано, что персистеры образуются стохастически, а оба типа (I–II) модулей токсин-анатоксин играют существенную

роль в формировании персистеров в некоторых модельных системах. На примере *Escherichia coli* и *Salmonella enterica* показано, что клетки персистеров являются гетерогенными и могут быть сформированы множественными путями и быть активированы независимо или параллельно (S.Semsey Denmark). Также представлена работа о влиянии формирования биопленок на устойчивость к антибиотикам у *Pseudomonas aeruginosa*, роль в этом процессе ключевых ферментов, инактивирующих бета-лактамы антибиотики и возможные другие механизмы устойчивости (J.Ayala, Chile). На этом же возбудителе показано, что совместное действие пептидов (Ocellatins-PT2 to-PT6), полученных из кожи лягушки, с антибиотиками позволяет сократить скорость образования биопленки у мультирезистентного изолята в результате увеличения мембранной проницаемости и облегченного проникновения антибиотика в клетку (L.J.Bessa Portugal). В отношении использования пептидов для борьбы с биопленками было также сообщение, свидетельствующее об эффективности для этих целей гидрофобно-катионоактивных пептидов, которые предотвращают образование и уничтожают сформированные биопленки (V.Ghate, Israel).

В разделе, посвященном новым перспективным диагностическим подходам, было представлено несколько докладов. В одном из докладов обсуждались вопросы применимости для анализа микробиома кишечника полногеномного секвенирования и интерпретации результатов в связи с анализом генома не только живых, но и мертвых клеток. Был предложен метод с активированной флюоресцентной меткой и использованием оборудования для клеточного сортирования с последующим секвенированием для выявления жизнеспособных клеток и решения таксономических задач (S.Tamburini, USA). Для изучения функционирования отдельной клетки в сложных микробных сообществах предложено использовать комплекс методов, основанных на изотопном анализе, с применением тяжелой воды (D_2O) и Романовской микроспектроскопии. Это позволяет охарактеризовать микробиом кишечника, включая исследование динамики белков слизистой оболочки кишки, аминокислот, сахаров, полисахаридов и гликанов (D.Berry, Austria). Показана также возможность выявления болезнетворных бактерий в пище с помощью неразрушающих колориметрических методов анализа метаболитов, в данном случае летучих органических компонентов. Были сделаны поликонденсационные датчики для сенсорного обнаружения сульфидных компонентов и колориметрического обнаружения нитрофенола. Сальмонеллы могли быть детектированы посредством обнаружения H_2S или нитрофенола в результате действия фермента C8-эстеразы. Золотистый стафилококк мог быть обнаружен по образованию нитрофенола, в результате глюкозидазной активности, меньше чем за 8 часов (E.Perret, France).

Один из интересных подходов к скринингу новых антибиотических веществ у актиномицетов был детально разработан и представлен. Предлагается использовать для скрининга личинки *Galleria mellonella* (TruLarv™), большой восковой моли (огнёвка пчелиная – вид молевидных бабочек из семейства огнёвки настоящие). Метод может использоваться в качестве недорогого, этичного и простого, моделирующего инфекции организма человека. Исследования показали, что есть хорошая корреляция между результатами, полученными

на *G. mellonella* и эффективностью препарата в людях. В этих исследованиях личинки были заражены *Pseudomonas aeruginosa* NCTC10662 с одновременным введением одного из пятидесяти природных антибиотических веществ и последующим вычислением LD50 (O.Champion, United Kingdom). Особая привлекательность метода в том, что с его помощью можно изучать не только перспективные антибактериальные вещества, но и оценивать выживаемость клинических штаммов в присутствии антибиотиков в зависимости от спектра устойчивости, не используя лабораторных животных.

Несколько докладов было посвящено возможности переноса генов антибиотикорезистентности с помощью бактериофагов на моделях *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*, а также при исследовании фаговых источников бета-лактамаз непосредственно в слюне пациентов с муковисцидозом (M.Brown-Jaque, Spain – два доклада).

В разделе, посвященном взаимодействиям микроба и хозяина, состоянию микробиома кишечника и его влиянию на здоровье человека, были использованы современные метагеномные подходы, позволившие выявить среди большого разнообразия и вариабельности бактериальной составляющей кишечника основное филогенетическое бактериальное ядро, присутствующее у всех здоровых людей, что представляет собой большой потенциал для понимания состояния и поведения данной экосистемы (D.Aguirre de Cárcer, Spain). Метагеномный анализ был осуществлен также для оценки бактериофаговой составляющей содержимого кишечника, о чем мало известно. Решались задачи развития методологии для метагеномного анализа вирусной части кишечника, воспроизводимости и чувствительности метода по сравнению с традиционно используемым выявлением 16 rDNA ампликонов, влияния условий проведения экспериментов. Было показано, что исследование «фагеомики» дает ценное дополнительное представление о структуре человеческого микробиома кишечника (A. Shkorporov, Ireland). Была также дана оценка различных метагеномных методов и используемых реагентов для исследования микробиома кишечника на примере *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. neoformans*, перхоть *M.*, *S. cerevisiae*, *A. fumigatus*, *P. crysogenum* (A.Frau, United Kingdom).

Большое внимание на конгрессе было уделено CRISPR-системе (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) – новой технологии редактирования геномов как бактерий, так и высших организмов, базирующейся на адаптивной иммунной системе бактерий. С общим докладом выступал один из лидеров в этой области – John van der Oost (Netherlands), который подробно описал известные на сегодняшний день механизмы работы CRISPR-системы. CRISPR-система представляет собой особые участки бактериальной ДНК, короткие палиндромные кластерные повторы (CRISPR). Между идентичными повторами располагаются отличающиеся друг от друга фрагменты ДНК – спайсеры, многие из которых соответствуют участкам геномов вирусов, паразитирующих на данной бактерии. При попадании вируса в бактериальную клетку он обнаруживается с помощью специализированных Cas-белков (CRISPR-associated sequence – последовательность, ассоциированная с CRISPR), связанных с CRISPR PHK. Если фрагмент вируса «записан» в спайсере CRISPR PHK, Cas-белки разрезают вирусную ДНК и уничтожают ее, защищая клетку от инфекции.

Были представлены данные о том, каким образом CRISPR-система принимает участие в защите бактерий от инфицирования вирусами, в регуляции метаболизма клеток, обеспечении вирулентности. Показана возможность переноса CRISPR-системы фагами в бактериальную клетку, несущую гены антибиотикостойчивости, что в итоге приводит к гибели бактериальной клетки. Системы CRISPR/Cas могут работать не только в клетках бактерий, но и в клетках высших организмов, а значит, CRISPR/Cas-системы дают возможность исправлять неправильные последовательности генов и таким образом лечить наследственные заболевания человека. Мощный молекулярный инструмент CRISPR/Cas, созданный на основе бактериального противовирусного иммунитета, позволяет редактировать как ДНК, так и РНК, наблюдая, как меняется функция гена и как это влияет на работу генома в целом (E.R.Westa, United Kingdom; D.Bikard, France; E.Charpentier, Germany; F.J.Martinez Mojica, Spain). Нужно также отметить, что высказывались опасения в отношении редактирования генома эукариот и использования технологии для генной терапии в связи с часто появляющимися необязательными мутациями в геноме при таком воздействии, связанные с еще недостаточно совершенной технологией.

Таким образом, насыщенная новыми данными программа форума FEMS 2017 показала, что уровень микробиологичес-

ких исследований, особенно в фундаментальном направлении, развивается быстрыми темпами, создавая новые методологические подходы к исследованию бактерий и новые штаммы с полезными свойствами. Фундаментальные результаты в высокой степени востребованы практикой, а именно биотехнологией, медициной, сельским хозяйством, ветеринарией, экологией. Наиболее важные направления исследований – это выявление механизмов антибиотикорезистентности и разработка подходов к ее преодолению, анализ и борьба с биопленками, синтетическая микробиология – искусственное создание отдельных органелл клеток и новых форм бактерий, исследование гетерогенности микробных популяций на предмет выявления специализированных кластеров, выявление персистирующих клеток возбудителей болезней, детальное изучение экосистем, начиная от кишечника человека и до океанов, развитие метагеномного анализа образцов для выявления микробного разнообразия и оценки «темной микробиологической материи» – некультивируемых клеток, исследование возможностей применения CRISPR/Cas-системы, как прорывной генно-инженерной технологии редактирования генома бактерий и эукариот.

И.А.Дятлов

<http://www.fems-microbiology2017.kenes.com/>

Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур

Список услуг, предоставляемых ГКПМ-Оболенск

ГКПМ-Оболенск



ГКПМ-Оболенск – специализированная коллекция, основными видами деятельности которой являются сбор, хранение и изучение патогенных штаммов бактерий, а также бактериофагов, грибов и клеточных линий.

Коллекция оказывает услуги:

- депонирование (в том числе для целей национальной патентной процедуры) различных микроорганизмов;
- предоставление тестовых штаммов (тест-культур, контрольных штаммов, референс-штаммов, стандартных эталонных штаммов), предназначенных для контроля качества питательных сред;
- идентификация и изучение микроорганизмов.

Руководитель ГКПМ-Оболенск – директор ФБУН ГНЦ ПМБ, академик РАН, д.м.н., профессор Дятлов Иван Алексеевич

Подразделение, ответственное за осуществление деятельности ГКПМ-Оболенск – отдел коллекционных культур ФБУН ГНЦ ПМБ

Заведующий отделом коллекционных культур – к.б.н. Богун Александр Геннадьевич
Тел.: +7 (4967) 36-00-00

Выдача* типовых (тестовых) штаммов микроорганизмов – Галкина Елена Вячеславовна
Тел.: +7 (4967) 31-21-56

*Для получения штаммов микроорганизмов необходимо подать заявку на бланке организации-заявителя. Заявка должна быть заверена подписью руководителя организации, приобретающей штамм и печатью организации. К заявке необходимо приложить копию лицензии на право работы с патогенными биологическими агентами. Для ускорения процедуры получения штаммов ГКПМ-Оболенск рассматривает факсимильные и электронные копии документов. Заявки необходимо отправлять на факс +7 (4967) 36-00-03 или электронный адрес info@obolensk.org. В заявке желательно указать контактные данные сотрудника, заинтересованного в получении штамма.

п/п	Наименование	Цена
1.	Выдача типовых штаммов микроорганизмов в лиофилизированном состоянии	2500 рублей за ампулу
2.	Депонирование штамма микроорганизма для целей национальной патентной процедуры	бесплатно
3.	Депонирование клеточной линии для целей национальной патентной процедуры	бесплатно
4.	Выдача депозитору образца депонированного штамма	500 рублей
5.	Идентификация микроорганизмов на системе MALDI-Biotyper:	
	1-3 культуры	1000 рублей за культуру
	4-10 культур	750 рублей за культуру
	≥11 культур	500 рублей за культуру
6.	Идентификация микроорганизмов по последовательности 16SrRNA и на системе MALDI-Biotyper:	
	1-3 культуры	7000 рублей за культуру
	4-10 культур	6000 рублей за культуру
	≥11 культур	5000 рублей за культуру
7.	Идентификация микроорганизмов на основании биохимических признаков с использованием системы микроб-автомат	по договоренности
8.	Идентификация микроорганизмов на основании биохимических признаков с использованием системы Biolog	по договоренности
9.	Идентификация микроорганизмов на основании биохимических признаков с использованием системы Vitek	по договоренности
10.	Определение метаболического профиля микроорганизма на системе Biolog	по договоренности
11.	Секвенирование генома микроорганизма на системах MiSeq и/или IonTorrent PGM (работы включают выделение ДНК микроорганизма, приготовление библиотеки, секвенирование, первичный биоинформационный анализ)	от 30 000 рублей за геном
12.	Наработка инактивированной биомассы микроорганизма	по договоренности
13.	Наработка препарата ДНК микроорганизма	по договоренности
14.	Другие исследования	по договоренности

Правила оформления статей (основные положения)

Журнал «Бактериология» публикуется на русском языке (резюме статей и ключевые слова – на русском и английском языках), распространяется на бумажном носителе и публикуется в электронной форме.

К публикации принимаются экспериментальные и обзорные статьи, а также короткие сообщения по прикладным и фундаментальным вопросам медицинской, ветеринарной и сельскохозяйственной бактериологии. Статьи принимаются без ограничения объема от граждан любой страны на русском языке. По согласованию с редакцией допускается публикация рекламных материалов, соответствующих тематике журнала.

Публикации, созданные в порядке выполнения служебного задания, должны иметь направление от учреждения, в котором выполнена работа. В направлении следует указать, что представленный материал ранее не был нигде опубликован и не находится на рассмотрении для публикации в других изданиях (включая зарубежные).

К публикации прилагается экспертное заключение организации об отсутствии ограничений для открытой публикации представленных материалов.

Материалы для публикации, включая сопровождающие документы, направляются в редакцию в электронной форме по адресу: info@obolensk.org или bacteriology@obolensk.org. В теме сообщения следует указать «Бактериология».

Требования к оформлению статьи.

Экспериментальная статья должна состоять из разделов: введение, материалы и методы, результаты и обсуждение, список литературы.

Рукопись должна быть подготовлена в текстовом редакторе MS Word, шрифт – Times New Roman, размер – 14, межстрочный интервал – 1,5, поля – 2 см. Статья должна включать резюме и ключевые слова на русском и английском языках. Нумерация всех страниц рукописи сквозная.

Краткие сообщения представляются без таблиц и рисунков.

Статья должна быть подписана всеми авторами, включая иностранных.

К статье следует приложить сведения об авторах на русском и английском языках с указанием адреса, контактных телефонов (служебного и мобильного), факса и электронной почты с указанием автора, ответственного за переписку с редакцией.

Заглавие статьи оформляется следующим образом:

НАЗВАНИЕ СТАТЬИ

И. И. Иванов*, П. П. Петров**

*Первая организация, г. Москва, РФ

**Вторая организация, Техас, США

E-mail

[далее текст аннотации и ключевые слова]

Текст статьи, включая резюме, список литературы, подписи к рисункам и таблицы, должны быть оформлены одним файлом, а каждый рисунок – отдельным файлом.

РЕЗЮМЕ статьи должно быть представлено на русском и английском языках, отражать основные полученные результаты и содержать не более 250 слов.

КЛЮЧЕВЫХ СЛОВ (словосочетаний) должно быть не более 10, на русском и английском языках.

Во ВВЕДЕНИИ (без заголовка) следует изложить мотивацию написания данной работы и отдельным абзацем обозначить цель исследования. Дополнительно на английском языке.

Раздел МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ должен содержать сведения об объекте исследования (включая источник получения, название коллекции) и краткое описание использованных методик, позволяющее их воспроизвести (на ранее опубликованные и общеизвестные методы дается ссылка); для приборов и реактивов указываются название фирмы на языке оригинала в кавычках и страны в скобках.

Следует использовать общепринятые современные сокращения мер, физических, химических и математических величин, терминов и т.д. Единицы измерения должны даваться в единицах СИ (Система Интернациональная). Обозначения мутантных и рекомбинантных форм микроорганизмов следует приводить в соответствии с международными правилами. Для трехбуквенного обозначения генов бактерий используются строчные буквы (курсив).

Рисунки и таблицы размещаются в тексте статьи в соответствии с пожеланиями авторов. Кроме того, черно-белые и цветные рисунки (в формате *.jpg) прилагаются к статье в виде отдельных файлов (ris1.jpg, ris2.jpg и т.д.)

Сведения о финансовой поддержке работы приводятся в конце текста статьи перед списком литературы.

В СПИСКЕ ЛИТЕРАТУРЫ указываются авторы, название статьи, название журнала или сборника, год, номер, страницы. Для названия журналов используются общепринятые сокращения (<http://www.nlm.nih.gov/>).

В случае невыполнения настоящих правил оформления статья не принимается и отсылается авторам на доработку.

Редакция оставляет за собой право редактировать статьи по согласованию с автором.

Присланные в редакцию статьи проходят процедуру рецензирования. В случае отклонения статьи редакция направляет автору мотивированный отказ.

Публикация – бесплатная.

Статьи направлять по адресу:

142279, Московская обл.,

Серпуховский р-н, п. Оболенск, ГНЦ ПМБ

Тел. (4967) 36-00-46

Факс (4967) 36-00-10

E-mail: info@obolensk.org

или

bacteriology@obolensk.org