БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology

2018 • том 3 • №1

В НОМЕРЕ

Конкурс публикаций молодых ученых

ISSN 2500-1027

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Научно-практический журнал

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

Ответственный секретарь
И.Г.Говорунов, к.б.н.
(Россия)

Редакционный совет

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

Учредитель

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

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
Подписной индекс по объединенному
каталогу «Пресса России»: 39920

Бактериология
Научно-практический журнал

2018 • том 3 • №1

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

Коллекции патогенных микроорганизмов – значение и проблемы
И.А.Дятлов **5**

Эпидемиология, свойства и лабораторная диагностика шига-токсин-продуцирующих *Escherichia coli*
Н.Н.Карцев, Э.А.Светоч **7**

Времяпролетная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбцией/ионизацией как современный метод анализа микроорганизмов
Д.А.Ковалев, Д.В.Ульшина, И.В.Кузнецова **13**

Новый штамм *Serratia sp.* ASf1, растущий при высоких концентрациях железа
Г.В.Хохлова, Т.В.Антипова, И.Ю.Филатова, А.Н.Звонарёв, Т.В.Кулаковская, М.Б.Вайнштейн **18**

Идентификация и диагностика возбудителей микоплазменных маститов коров при помощи бактериологических и молекулярно-генетических методов
Э.Д.Шнейдер, С.А.Макавчик **22**

Создание базы данных клинических штаммов грамотрицательных бактерий для изучения молекулярных механизмов антибиотикорезистентности
П.В.Слукин, А.И.Лев, Е.И.Асташкин, Э.А.Светоч, Н.К.Фурсова **26**

Санитарно-микробиологическое состояние вод малых водоемов Ленинградской области
П.А.Полистовская, К.П.Кинаревская, А.А.Бахта, А.Б.Балыкина, П.Д.Бохан **33**

Клонирование и экспрессия генов биосинтеза сидерофора иерсиниахелина *Yersinia pestis* в клетках *Escherichia coli*
Д.А.Кузнецова, О.Н.Подладчикова **36**

Эпидемиология, свойства и лабораторная диагностика энтеротоксигенных *Escherichia coli*
Н.Н.Карцев, Н.К.Фурсова **45**

Сравнение классических и экспресс-методов выявления бактерий при микробиологическом контроле говядины
В.В.Можаева, А.С.Смолькина **50**

Совершенствование биотехнологических процессов получения диагностических препаратов для выявления возбудителя туляремии с использованием иммобилизованных носителей
Т.В.Жарникова, И.В.Жарникова, Ю.М.Евченко **55**

Современные подходы к выделению и очистке холерного тест-токсина
О.С.Дуракова, О.В.Громова, Л.Ф.Ливанова, Н.Г.Авдеева, Ю.И.Самохвалова, А.В.Гаева, М.Н.Киреев, О.А.Волох **59**

Оценка действия полимерного соединения на процесс формирования микробных биопленок штаммами *Pseudomonas aeruginosa*
Р.А.Верховский, О.В.Нечаева, Е.И.Тихомирова **63**

Идентификация и изучение антибиотикорезистентности бактерий, выделенных из маститного молока
Л.С.Киреева, С.А.Макавчик **67**

Использование почвенных сапрофитов *Bacillus spp.* в качестве биоиндикаторов токсикологического загрязнения серой лесной почвы
И.В.Канина, Н.А.Головина **71**

Краткие сообщения

Вакцина чумная молекулярная микроинкапсулированная (ВЧММ) **74**

О создании Ассоциации «Национальное научно-практическое общество бактериологов» **76**

Правила для авторов **78**

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"yaasүren 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, prof. (England)
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

Bacteriology
Scientific and Practical Journal

2018 • volume 3 • No 1

CONTENTS

Editor-in-Chief's Introduction

Problems of pathogenic microorganisms collections
I.A.Dyatlov **5**

Epidemiology, properties and laboratory diagnostics of *E.coli*-Producing shiga–toxins
N.N.Kartsev, E.A.Svetoch **7**

Time-of-flight mass spectrometry with matrix laser desorption/ionization as a modern method of analysis of microorganisms
D.A.Kovalev, D.V.Ulshina, I.V.Kuznetsova **13**

A new strain of *Serratia sp.* ASf1, growing at high iron concentrations
G.V.Khokhlova, T.V.Antipova, I.Yu.Filatova, A.N.Zvonarev, T.V.Kulakovskaya, M.B.Vainshtein **18**

Identification and diagnostics of pathogens of bovine mycoplasma mastitis by bacteriological and molecular genetic methods
E.D.Shneyder, S.A.Makavchik **22**

The gram-negative bacterial clinical strains database for studying of antibacterial resistance molecular mechanisms
P.V.Slukin, A.I.Lev, E.I.Astashkin, E.A.Svetoch, N.K.Fursova **26**

Sanitary and microbiological status of waters in small water bodies in the Leningrad region
P.A.Polistovskaya, K.P.Kinarevskaya, A.A.Bakhta, A.B.Balykina, P.D.Bokhan **33**

Cloning and expression of *Yersinia pestis* yersiniachelin siderophore biosynthesis genes in *Escherichia coli*
D.A.Kuznetsova, O.N.Podladchikova **36**

Epidemiology, properties and laboratory diagnostics of enterotoxigenic *Escherichia coli*
N.N.Kartsev, N.K.Fursova **45**

Comparison of the classic methods of bacterial detection and express analyzers during the microbiological control of beef
V.V.Mozhaeva, A.S.Smolkina **50**

Improvement of biotechnological processes for the production of diagnostic products for the detection of the causative agent of tularemia using immobilized media
T.V.Zharnikova, I.V.Zharnikova, Y.M.Yevchenko **55**

Modern approaches to the selection and prufication of cholera test-toxin
O.S.Durakova, O.V.Gromova, L.F.Livanova, N.G.Avdeeva, Yu.I.Samokhvalova, A.V.Gaeva, M.N.Kireev, O.A.Volokh **59**

Evaluation of the action of polymer connection on the process of formation of microbial biofiles by *Pseudomonas aeruginosa*
R.A.Verkhovsky, O.V.Nechaeva, E.I.Tikhomirova **63**

Identification and study of the antibiotic-resistance of bacteria from mastitide milk
L.S.Kireyeva, S.A.Makavchik **67**

Soil profile *Bacillus spp*. as bioindicators of toxicological pollution of gray forest soil
I.V.Kanina, N.A.Golovina **71**

Brief Communication

Molecular Microencapsulated Plague Vaccine (MMPV) **74**

On Setting Up the Association «National Science-and-Practice Society for Bacteriologists» **76**

Instructions for Authors **78**

Бактериология, 2018, том 3, №1, с. 5–6
Bacteriology, 2018, volume 3, No 1, p. 5–6

Коллекции патогенных микроорганизмов – значение и проблемы

Коллекционная деятельность в микробиологии является одной из основных функций, обеспечивающих решение таких задач, как построение систематики, оценка микробиологического разнообразия в различных экосистемах (от полости рта до мирового океана), разработка специфичных гено- и иммунодиагностических средств, генотипирование патогенов, в том числе для решения задач молекулярной эпидемиологии при выяснении территориальной приуроченности выделяемых при вспышках и эпидемиях штаммов, анализ распространенности возбудителей с маркерами лекарственной устойчивости, создание средств профилактики и лечения и др.

В разных странах мира системы коллекционирования патогенных микроорганизмов построены по-разному – могут иметь место централизация и управление на уровне министерств или отдельных учреждений с высоким научным потенциалом, создание коммерческих коллекционных структур, работающих под контролем государства и др.

В России, традиционно, государственные коллекции патогенных микроорганизмов сосредоточены в научных учреждениях разных ведомств (Минздрав РФ, Минобороны РФ, Роспотребнадзор, Россельхознадзор, Минсельхоз РФ). Всего 9 государственных коллекций, ведущих собственный сбор, идентификацию, коллекционирование, каталогизацию патогенных бактерий, вирусов и грибов. Кроме того, в стране существует, по нашим данным, порядка 100 исследовательских коллекций, фонды которых малоизвестны и малодоступны для учреждений других ведомств. Эти коллекции, в основном содержащие возбудители III–IV групп патогенности по национальной классификации, могут появляться и исчезать с течением времени из-за в основном субъективных причин – наличия или отсутствия исследовательских групп, заинтересованных в создании коллекций патогенов для решения научных или прикладных задач. Между тем штаммы из таких коллекций редко попадают в государственные коллекции, так как нет общей системы сбора, хранения, транспортировки выделяемых штаммов из исследовательских коллекций и просто микробиологических лабораторий в специализированные учреждения. Между тем исследовательские коллекции представляют значительный практический интерес, так как работают в основном со свежевыделенными на территориях штаммами, которые, в свою очередь, могут быть использованы для создания информационных систем о пейзаже штаммов, приуроченных к определенным территориям, и давать возможность оценивать и прогнозировать их распространение.

Существенной проблемой является межведомственная разобщенность деятельности в области коллекционирования патогенов, когда в государственных коллекциях одного ведомства нет информации о спектре фено- и генотипических признаков штаммов, находящихся в учреждениях других ведомств. Это не позволяет в оперативном режиме решать проблемы, стоящие перед эпидемиологическими службами по выявлению источников заражения и происхождению возбудителя.

Ключевой задачей коллекций патогенов является создание и ведение каталогов. По мнению комитета Всемирной Федерации Коллекционных Культур (WFCC), «нет каталога – нет коллекции». Основными принципами каталогизации коллекций являются: производительность и готовность, простота и легкость использования, целостность, безопасность, секретность (где это необходимо). Каталоги должны регулярно обновляться, электронная форма является предпочтительной. Существующие отечественные электронные каталоги представлены в разных форматах и содержат произвольно отобранные данные. В то же время зарубежные каталоги коллекций микроор-

ганизмов (ATCC, DSMZ и т.д.) размещены в сети Интернет и снабжены функцией расширенного поиска и отбора информации.

Для решения накопившихся проблем в стране в области коллекционирования патогенов и возможности использования такой информации в эпидемиологическом анализе, при расшифровке вспышек инфекционных заболеваний, выявлении причин и источников заражения людей, необходимо предпринять ряд неотложных мер, прежде всего межведомственного характера.

Необходимо:

• создание усилиями органов исполнительной власти, имеющих в своем ведении государственные коллекции патогенов, «Национального интерактивного каталога коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов» на основе полностью отечественного программного обеспечения и содержащего исчерпывающую информацию о всех хранящихся и вновь выделяемых штаммах патогенных микроорганизмов;

• создание государственной системы профессионального управления коллекциями как объединенным отечественным фондом патогенных микроорганизмов, разработка и реализация мер целевой государственной поддержки коллекций;

• развитие современных стандартизированных технологий сбора коллекционных фондов, определения основных каталогизируемых свойств возбудителей и методологий сохранения их в жизнеспособном состоянии;

• повышение престижности работы в коллекциях для молодых сотрудников за счет насыщения деятельности профильными научными направлениями (поддержка через ФЦП и гранты работ по секвенированию и аннотированию геномов, таксономии, резистентности, молекулярной эпидемиологии и т.п.) и широкими аутсорсинговыми задачами по разработке с использованием коллекций средств диагностики, профилактики и лечения;

• разработка механизма создания дублирующих коллекций для сохранения фондов в случае разрушения инфраструктуры коллекции или в особый период. Задача – сохранение типовых штаммов патогенов и штаммов, важных для производства вакцин, иммуноглобулинов и диагностикумов в виде сухих стандартных образцов;

• совершенствование физической и биологической защищенности коллекций за счет внедрения новых технологий и оборудования для охранной деятельности и контроля доступа, организации и внедрения новых форм контроля и учета движения культур, информационной защищенности, перекрестного контроля за персоналом коллекций, внедрения новых элементов защиты сотрудников.

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

Конкурс публикаций молодых ученых

Этот выпуск журнала «Бактериология» содержит публикации, представленные на конкурс молодых ученых на лучшую статью по тематике журнала. Конкурс проводится с целью поддержки перспективных молодых исследователей, содействия их профессиональному росту и поощрения творческой активности молодых ученых. К конкурсу допускали статьи, первый автор которых не старше 35 лет, а число соавторов не старше 35 лет – не менее половины.

DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-7-12

Бактериология, 2018, том 3, №1, с. 7–12
Bacteriology, 2018, volume 3, No 1, p. 7–12

Эпидемиология, свойства и лабораторная диагностика шига-токсин-продуцирующих *Escherichia coli*

Н.Н.Карцев, Э.А.Светоч

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

Пищевые инфекции, вызываемые шига-токсин-продуцирующими штаммами *E. coli* (STEC), – актуальная проблема общественного здравоохранения многих стран мира, включая высокоразвитые: США, Канаду, страны Европейского Союза, Японию и др. Начиная с 1990-х гг. заболевания, обусловленные STEC-штаммами, регистрируют и в Российской Федерации. STEC-штаммы часто вызывают обычную водянистую диарею, которая, как правило, заканчивается выздоровлением в течение нескольких дней, реже — тяжелые формы болезни – геморрагическую диарею (геморрагический колит, ГК) и ассоциированный с ней гемолитико-уремический синдром (ГУС). Наибольшую опасность, особенно для детей младшего возраста и пожилых людей, представляет ГУС, при котором у больного развиваются острая почечная недостаточность, тромбоцитопения и гемолитическая анемия. Смертность среди пациентов с ГУС может достигать 5% и более; у 10–50% пациентов, перенесших ГУС, в течение длительного периода имеют место осложнения в виде хронической почечной недостаточности, диабета, невралгических нарушений и других патологий. Эффективных методов лечения STEC-инфекций до настоящего времени не предложено; применение антибиотиков не рекомендуется, поскольку их применение повышает риск возникновения ГУС у детей и пожилых пациентов. Лечение инфекции в основном симптоматическое и предполагает введение больному жидкостей и электролитов, гемодиализ.

Ключевые слова: шига-токсин-продуцирующие E. coli, геморрагический колит, гемолитико-уремический синдром

Для цитирования: Карцев Н.Н., Светоч Э.А. Эпидемиология, свойства и лабораторная диагностика шига-токсин продуцирующих *Escherichia coli*. Бактериология. 2018; 3(1): 7–12. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-7-12

Epidemiology, properties and laboratory diagnostics of *E.coli*-Producing shiga–toxins

N.N.Kartsev, E.A.Svetoch

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

The foodborne infections caused by shiga toxin produced by *E. coli* strains (STEC) are an urgent public health problem in many countries of the world, including highly developed ones: the USA, Canada, the European Union, Japan, etc. Since the 1990s, STEC-strains are also recorded in the Russian Federation. STEC-strains often cause normal watery diarrhea, which usually ends in a recovery within a few days, less often severe forms of the disease-hemorrhagic diarrhea (hemorrhagic colitis, HA) and associated hemolytic-uremic syndrome (HUS). The greatest danger, especially for young children and the elderly, is the HUS, in which the patient develops acute renal failure, thrombocytopenia and hemolytic anemia. Mortality among patients with HUS can reach 5% or more; in 10–50% of patients undergoing HUS, complications in the form of chronic kidney failure, diabetes, neuralgic disorders and other pathologies have been occurring for a long time. Effective treatments for STEC infections have not been proposed to date; the use of antibiotics is not recommended, since their use increases the risk of HUS in children and elderly patients. Treatment of the infection is mainly symptomatic and involves the administration of fluid to the patient and electrolytes, hemodialysis.

Keywords: shiga-toxin producing E. coli, hemorrhagic colitis, hemolytic-uremic syndrome

For citation: Kartsev N.N., Svetoch E.A. Epidemiology, properties and laboratory diagnostics of *E.coli*-Producing shiga–toxins. Bacteriology. 2018; 3(1): 7–12. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-7-12

Для корреспонденции:

Карцев Николай Николаевич, 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) 36-0079
E-mail: kartsev@obolensk.org

Статья поступила 18.01.2018 г., принята к печати 30.03.2018 г.

For correspondence:

Nikolay N. Kartsev, researcher of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology department, 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) 36-0079
E-mail: kartsev@obolensk.org

The article was received 18.01.2018, accepted for publication 30.03.2018

Энтерогеморрагические *E. coli* – ЕНЕС

Энтерогеморрагические *E. coli* вызывают значительную заболеваемость и смертность во всем мире. Для группы ЕНЕС характерно наличие в их геномах определенного набора генов патогенности: *rfb, eae, stx1, stx2, ehx*, контролирующих соответственно синтез специфических липополисахаридов, основного антигена адгезии – интимина, шига-токсинов 2-го и/или 1-го типов, энтерогемолизина. Наиболее частым возбудителем геморрагического колита (ГК) и гемолитико-уремического синдрома (ГУС) является энтерогеморрагическая *E. coli* серотипа O157:H7, однако к данной патогруппе могут принадлежать и *E. coli* многих других серогрупп, основными среди которых являются серогруппы O26, O45, O55, O91, O103, O104, O111, O113, O121, и O145 [1]. В последние годы эпидемиологическая значимость указанных выше серогрупп *E. coli* в возникновении пищевых инфекций постоянно возрастает, особенно это касается ЕНЕС серогруппы O26 [2]. Тем не менее, серотип *E. coli* O157:H7 остается ведущим возбудителем тяжелых форм ГК и ГУС и основной причиной летальных исходов, причем число тяжелых форм болезни и число госпитализаций больных при *E. coli* O157:H7 инфекции увеличиваются. Эту тенденцию исследователи связывают с повышением вирулентности возбудителя, причины которого остаются неясными [3].

Шига-токсин-продуцирующие *E. coli*, не относящиеся к ЕНЕС

Наиболее ярким представителем неэнтерогеморрагических эшерихий является штамм *E. coli* O104:H4, вызвавший вспышку в Европе в 2011 г. По имеющимся в литературе данным, случаи выделения энтероаггрегативных шига-токсин-продуцирующих (Ag-STEC) штаммов *E. coli* серотипа O104:H4 начали регистрировать с 2001 г. До 2009 г. было зарегистрировано 5 спорадических случаев выявления Ag-STEC O104:H4 от больных с ГК и ГУС в Германии, Франции, Норвегии и Италии [4]. В 2009 г. были зарегистрированы 25 случаев ГУС в Грузии. Среди заболевших 52% составляли дети младше 15 лет, 68% – женщины. Семь человек умерли, среди них двое детей в возрасте до 15 лет. Во время вспышки были выделены два штамма *E. coli* серотипа O104:H4 2009EL-2050 и 2009EL-2071, в которых были определены гены *stx2a, aggR* и *aatA*. Оба штамма были устойчивы к ампициллину, стрептомицину, сульфизоксазолу и триметоприм/сульфометоксазолу. Один из них также был устойчив к триметоприму.

Вспышка ГУС в сентябре 2011 г. охватила несколько европейских государств. Штаммы Ag-STEC *E. coli* O104:H4 были выделены от французских туристов, вернувшихся после отдыха из Турции (8 случаев), и от больных с ГУС и ГК во Франции, Дании, Люксембурге и Германии. Все эти случаи связывают с путешествиями в Турцию и Северную часть Африки [4].

Спорадические случаи выделения Ag-STEC *E. coli* O104:H4 от больных с ГУС описаны в Бельгии в 2013 г. – от 42-летней женщины, вернувшейся после отдыха в Тунисе, и от 14-летней девочки спустя неделю после отдыха в Турции. Оба штамма несли основные гены вирулентности STEC и EAgEC, идентичные «германским» штаммам, а именно *stx2a, aggR* и *aaiC*.

В настоящее время достоверно не определен естественный резервуар энтероаггрегативных шига-токсин-продуцирующих *E. coli* серотипа O104:H4. Несколькими группами исследователей выдвинуто предположение, что в качестве резервуара данной инфекции может рассматриваться человек и что занос данной инфекции в развитые страны может осуществляться путешественниками и мигрантами из эндемичных по данному возбудителю стран [5].

Факторы вирулентности ЕНЕС

Штаммы ЕНЕС участвуют в развитии патогенеза ГК и ГУС с помощью различных механизмов, таких как адгезия, индукция провоспалительных изменений и повреждения эпителиальных и эндотелиальных клеток, токсинообразование [6]. Во многом набор факторов вирулентности ЕНЕС схож с таковым у энтеропатогенных *E. coli*, но, несмотря на то, что данные патотипы генетически связаны между собой, многие особенности их эпидемиологии, развития патогенеза и ниш, которые они занимают в организме человека, уникальны. Так, инфицирующая доза ЕРЕС составляет от 10^8 до 10^{10} КОЕ для взрослого человека, в то время как инфицирующая доза ЕНЕС намного меньше и, по некоторым оценкам, составляет менее 100 КОЕ [7].

Интимин – белок внешней мембраны клеток ЕНЕС с молекулярной массой 92–94 кДа. Интимин является основным адгезином ЕНЕС, обеспечивающим тесный контакт (через Tir рецептор) клетки патогена с энтероцитом, что является ключевым в процессе развития феномена A/E (attaching and effacing) – прилипания и сглаживания энтероцитов энтерогеморрагическими эшерихиями. Гены *eae*, контролирующие синтез интимина, локализованы на острове патогенности LEE. В настоящее время насчитывается более 17 типов интимина, у которых отмечаются высокая гомология N-терминального конца и большие различия в С-терминальном регионе, который существенен для связывания с рецептором Tir у штаммов, вызывающих ГК и ГУС. У STEC штаммов, патогенных для человека, как правило, присутствует интимин-*гамма* [8].

Белки третьего типа секреции (TTSS) играют важную роль в патогенезе как ЕРЕС, так и ЕНЕС. Эти возбудители используют систему секреции типа III для прикрепления бактерий на энтероциты и секреции нескольких инъекционных токсинов Esp (*E. coli* secreted protein), кодируемых LEE локусом. Секреция белков Esp необходима для трансдукции сигнала в клетках хозяина и формирования A/E-повреждений [9]. EspA образует филамент, связывающий бактерию с клеткой-мишенью; EspF способствует созданию тесной связи между бактерией и клеткой-мишенью; EspB и EspD нарушают функционирование мембранных сигнальных систем и формируют поры в клеточной мембране, через которые инъецируется молекула белка Tir, где она фосфорилируется, образуя рецептор для интимина. В настоящее время известно по меньшей мере 39 белков TTSS, кодируемых LEE локусом у штаммов ЕНЕС, которые секретируются в цитоплазму энтероцитов [10].

ЕНЕС плазмида pO157 несет на себе гены, кодирующие белки, вовлеченные в патогенез ЕНЕС-инфекции: гемолизин HlyA; сериновую протеазу EspP, участвующую в расщеплении фактора коагуляции V в сыворотке крови человека;

белок ToxB с молекулярной массой 362 кДа, схожий по своей аминокислотной последовательности с клостридиальными токсинами; каталазу и цинк-металлопротеиназу StcE, которая секретируется системой секреции *etp* типа II, расщепляет ингибитор С1 эстеразы (C1-INH) системы комплемента, обладает муциназной активностью и, как предполагают, участвует в колонизации и повреждении эпителия тонкого кишечника [11]. Кроме того, данная плазмида несет ряд других важных генов вирулентности, таких как *katP* (периплазматическая пероксидаза каталазы), *toxB* (гомолог белка, способствующего адгезии) и *subAB1* (субтилазоподобная сериновая протеаза – токсин) [12].

Изучение продукции цитотоксинов *E. coli* параллельно несколькими группами исследователей привело к использованию двух разных названий токсинов – вероцитотоксины (VT) и шигаподобные токсины (Shiga-like toxins, SLT), которые с 1994 г. считаются взаимозаменяемыми. В настоящее время более широко используемой аббревиатурой шигатоксина является Stx. Штаммы STEC имеют два типа токсинов: шига-токсин типа 1 (Stx1), идентичный токсину *Shigella dysenteriae* типа 1, и иммунологически отличный от Stx1 шига-токсин типа 2 (Stx2) [13].

Шига-токсины кодируются опероном, имеющим следующую структуру: ген субъединицы *stxA* располагается непосредственно перед геном субъединицы *stxB* с короткой межгенной последовательностью. Белок токсина состоит из пяти В-субъединиц и одной субъединицы А, образующих голотоксин. Ферментативная активность (N-гликозидаза) обеспечивается сродством фермента к специфическим гликолипидным рецепторам энтероцита. Биологические свойства Stx включают в себя энтеротоксичность, нейротоксичность и цитотоксичность. По различиям биологической активности и нуклеотидного состава генов шига-токсины подразделяют на типы и подтипы. Перечисленные различия шига-токсинов являются клинически значимыми, что проявляется в способности одних подтипов вызывать заболевания с более мягким течением, а других – серьезные осложнения, такие как ГУС [14].

Систематизация шигатоксинов была предложена на VII Международном симпозиуме по VTEC инфекции, состоявшемся в 2009 г, принята в окончательном виде на 8-м симпозиуме VTEC в Амстердаме в 2012 г. [15]. Номенклатура шига-токсинов представляет собой трехуровневую систему обозначения: тип, подтип и вариант.

Тип указывает на принадлежность к одной из двух основных ветвей семейства шига-токсинов, которые имеют общую структуру и функцию, но не нейтрализуются гетерологичными антителами к Stx/Stx1 и Stx2. Для обозначения шигатоксинов *E. coli* и других бактерий, а также их генов используют арабские цифры после «Stx» или «stx».

Подтипы представляют собой группы шига-токсинов, схожих по своей антигенной структуре и нуклеотидной последовательности генов. Для обозначения подтипов используют суффиксы со строчными буквами латинского алфавита: Stx1a, Stx1c, Stx1d, Stx2a Stx2g. Очевидно, что согласованная номенклатура и стратегии субтипирования шигатоксинов необходимы для улучшения эпиднадзора и прогнозирования рисков, связанных с конкретными инфекциями STEC [15].

Под вариантом шига-токсина подразумевают конкретные подтипспецифические прототипические токсины или родственные токсины в подтипе (которые отличаются одной или более аминокислотами от прототипа). Обозначение вариантов включает в себя тип и подтип токсина, а также О-группу, если штаммом-хозяином является *E. coli* (Stx1a-O157-EDL933, Stx2c-O157-E32511), или название других бактерий, из которых выделен токсин (Stx2a-Acinetobacter-haemolyticus-DS9B). Таким образом, название варианта токсина включает О-серотип, название штамма, а также название микроорганизма, в котором впервые был обнаружен данный токсин.

На основе предложенной классификации разработан метод субтипирования генов шига-токсинов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), который был независимо протестирован на панели из 48 референс-штаммов STEC и усовершенствован в шести клинических и исследовательских центрах для проверки воспроизводимости, чувствительности и специфичности протокола ПЦР [15].

EHEC-гемолизин (Hly, Ehx) является одним из важных вспомогательных факторов вирулентности EHEC, поскольку он участвует в развитии патогенеза с помощью таких механизмов, как адгезия, индукция провоспалительных изменений и повреждения эпителиальных и эндотелиальных клеток [6]. Энтерогемолизин принадлежит к семейству токсинов RTX (repeat in toxin), вызывающих гемолиз эритроцитов теплокровных животных. Кодируется опероном EHEC-hly ABCD, расположенным на большой плазмиде вирулентности EHEC pO157. Важно отметить, что EHEC-hlyA всегда присутствует на плазмидах pO157 у типичных сорбитол-отрицательных *E. coli* O157:H7 [8].

Лабораторная диагностика STEC

В качестве скрининговых методов диагностики возбудителей STEC-инфекции широко используются иммунохроматографические тесты и реакция латексной агглютинации, которые дают ответ в течение нескольких минут без применения какой-либо аппаратуры. В реакции латекс-агглютинации выявляют соматический и жгутиковый антигены *E. coli*, что позволяет дифференцировать *E. coli* серотипа O157:H7 от других серотипов. Высокая специфичность данных тестов дает основание для идентификации, но отрицательный результат нуждается в подтверждении традиционным комплексом лабораторных исследований – первичного посева проб клинического материала и пищевых продуктов на среды обогащения: лактозный бульон с бриллиантовым зеленым и желчью, среды с новобиоцином, акрифлавином и цефиксимом (для выделения *E. coli* серогруппы O157) [16], среды с ванкомицином и теллуритом калия (для выделения *E. coli* серогруппы O111), среды с новобиоцином и комплексом ванкомицина, теллурита калия и цефиксима (для выделения *E. coli* серогруппы O26) [17].

Для селективного выделения *E. coli* основных серогрупп, ассоциированных со STEC-инфекцией (O26, O45, O103, O104, O111, O121, O145 и O157), также разработан метод иммуномагнитной сепарации, который позволяет концентрировать *E. coli* с антигенами данных серогрупп из клинических образцов, воды и продуктов питания. Целесообразность такого подхода диктуется низким титром штаммов EHEC во многих тестируемых пробах. Использование иммуномагнит-

ной сепарации позволяет существенно повысить чувствительность бактериологического метода и ПЦР-детекции, что послужило основанием для внедрения этого метода в ГОСТ 32011-2013 (ISO 16654:2001) «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения *Escherichia coli* O157».

Разработаны селективные питательные среды, позволяющие дифференцировать *E. coli* серогруппы O157 по неспособности ферментировать сорбит и/или рамнозу и отсутствию фермента бета-глюкуронидазы [18]. Дифференциально-диагностические среды используют также для выявления штаммов, продуцирующих энтерогемолизины (90% штаммов EHEC). Применение хромогенных сред основано на выявлении активности ферментов β-D-глюкуронидазы/β-D-галактозидазы, что ускоряет идентификацию изолятов EHEC и позволяет различить штаммы в зависимости от наличия упомянутых ферментов по цвету [19]. К сожалению, хромогенные среды не обладают достаточной чувствительностью и специфичностью для обнаружения STEC, чтобы заменить прямые методы детекции шига-токсинов. Данные среды служат для облегчения процесса выделения штаммов STEC из образцов, в которых наличие шига-токсинов предварительно было определено с использованием более чувствительных методов, таких как иммунохроматография или ПЦР [20].

Определение серотипа изучаемых штаммов EHEC производят с помощью реакций агглютинации и латекс-агглютинации, иммунохроматографического и иммуноферментного тестов, а также молекулярно-генетическими методами [21]. Иммунологические методы имеют ряд недостатков, таких как трудоемкость выполнения и большое количество перекрестных реакций. В последнее десятилетие в мировой практике наиболее достоверными способами определения основных серогрупп энтерогеморрагических *E. coli* считаются молекулярно-генетические методы, а именно ПЦР с электрофоретической или гибридизационно-флюоресцентной детекцией [22]. Молекулярно-генетический метод основан на том, что у *E. coli* гены ферментов «домашнего хозяйства», участвующих в синтезе О-антигена, располагаются в О-кластере (известном как *rfb*-кластер). Количество генов в кластере варьирует у штаммов разных серогрупп. На данных различиях основан молекулярный метод серотипирования *E. coli* с помощью ПЦР, который позволяет различить О-группы по размеру и нуклеотидной последовательности амплифицируемого участка О-кластера [23].

В настоящее время в странах Европейского союза разработаны и внедрены в практику протоколы детекции основных серогрупп энтерогеморрагических *E. coli* в образцах пищевой продукции (мясной фарш, салаты, пророщенные семена) с помощью ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией. Данные методы позволяют с большой точностью и в короткие сроки определить наличие или отсутствие в образце штаммов STEC одной из основных серогрупп: O26, O45, O55, O91, O103, O104, O111, O113, O121, O145 и O157 [24].

Помимо классической ПЦР и ПЦР с детекцией в режиме реального времени, для идентификации различных серогрупп *E. coli* на сегодняшний день разрабатывают и применяют ДНК-биочипы. Данная технология позволяет за один анализ протестировать образец ДНК на наличие в нем более 30 серогрупп-ассоциированных генов и, как следствие, сократить трудоемкость и время анализа [25]. Однако данная технология достаточно редко используется в практике из-за своей высокой стоимости.

Завершающими этапами лабораторной диагностики являются детекция у изучаемых штаммов генов, кодирующих шига-токсины, а также выявление продукции шига-токсинов. Сложность интерпретации получаемых результатов исследований заключается в том, что у EHEC проявляется нестабильность экспрессии генов шига-токсинов, а также в том, что способность образовывать шига-токсины свойственна некоторым другим бактериям – *Shigella spp., Campylobacter spp., Citrobacter spp., Pseudomonas spp.* и *Edwardsiella spp.* [26].

Лечение и профилактика эшерихиозов

В настоящее время отсутствует единый подход к терапии эшерихиозов, в частности, у детей. Однако проведенные в последние годы отечественными клиницистами исследования показали эффективность стартовой терапии антибактериальными препаратами и энтеросорбентами в комплексе с пероральной регидратацией. Учитывая тот факт, что сложность назначения оптимальной этиотропной терапии, важным моментом которой является выбор антибактериального препарата, связана с постоянной изменчивостью чувствительности эшерихий к применяемым антибиотикам и ростом числа антибиотикорезистентных штаммов, рекомендуется применять антибактериальные препараты, показавшие свою клиническую эффективность. Проведенные исследования показали, что такими препаратами выбора при осложненном течении эшерихиозов у детей являются нифуроксазид и налидиксовая кислота. В этом же исследовании был установлен высокий клинический эффект назначения энтеросорбентов, таких как диоктаэдрический смектит и полиметилоксана полигидрат в сочетании с пероральной регидратацией в стартовой терапии неосложненных эшерихиозов в возрастных дозах курсом 3–5 дней [27].

Оптимальные методы лечения STEC-инфекций в настоящее время отсутствуют. Применение антибиотиков вызывает лизис клеток STEC в кишечнике человека, а следовательно, и дополнительный выброс шига-токсинов в кровеносную систему и усугубление патологических процессов у больного. Кроме того, антибиотики могут индуцировать переход фага из неактивной фазы (профага) в активную (литическую), что также способствует накоплению шига-токсинов в организме больного. В настоящее время при лечении ГУС назначают поддерживающую терапию, основанную на введении больному жидкостей и электролитов, а также гемодиализе [1]. К способам профилактики ГУС относят соблюдение правил личной гигиены (частое мытье рук, исключение купания в загрязненных водоемах), качественную кулинарную обработку пищевых, особенно мясных продуктов, уменьшение фекального загрязнения мяса во время или после убоя животных [28].

Перспективы разработки профилактических препаратов против ETEC и STEC инфекций, на основе факторов вирулентности их возбудителей

К настоящему времени разработаны несколько типов вакцин против STEC-инфекции: корпускулярные убитые

(бактерины), которые, как показали испытания, не защищали сельскохозяйственных животных от колонизации клетками *E. coli* O157:H7 [29]; живые векторные вакцины, сконструированные на основе аттенуированных сальмонелл, несущих гены протективности антигенов EHEC (интимин и белки 3 типа секреции), которые эффективно защищали экспериментальных животных от заражения их клетками EHEC [30]; субъединичные вакцины, при конструировании которых использовали генно-инженерные двух- или трехкомпонентные слитные белки, состоящие из белков антигена адгезии – интимина и белков 3 типа секреции – EspA, EspB, Tir, а также белков детоксицированных A- и B-субъединиц шига-токсинов [31]; субъединичные вакцины с пориновыми белками и белками рецепторов сидерофоров – две коммерческие вакцины, эффективно защищающие крупный рогатый скот от носительства *E. coli* O157:H7, стимулирующие у вакцинированных лабораторных животных антитоксический и мукозальный антиколонизационный иммунитет [32]; липополисахаридная вакцина, которая при ее испытании на взрослых волонтерах и детях вызывала у вакцинированных образование антител IgG и IgM в высоких титрах. В течение длительного времени сыворотки крови пациентов обладали высокой бактерицидной активностью в отношении клеток *E. coli* O157:H7 [33].

Для эффективной защиты от штаммов STEC в перспективе необходима вакцина, которая защищала бы человека не только от *E. coli* O157:H7 и *E. coli* O104:H4, но и от шига-токсин-продуцирующих штаммов других серологических групп, в том числе не относящихся к энтерогеморрагическому патотипу (не-EHEC), поскольку удельный вес последних в патологии ГК и ГУС постоянно возрастает.

Заключение

Непростая эпидемиологическая ситуация по STEC-инфекциям, отмечаемая во многих странах, осложняется отсутствием на сегодняшний день в клинической практике эффективных методов лечения ГК и ГУС, поскольку этиотропная химиотерапия в данном случае противопоказана, она лишь увеличивает риски появления ГУС у больных ГК и утяжеляет течение болезни. Лечение ГК и ГУС остается пока только симптоматическим. Специфические средства профилактики и лечения отсутствуют.

Изучение STEC методами молекулярной биологии и эпидемиологии позволило выявить их основные факторы вирулентности, ассоциированные с основными клиническими проявлениями данных инфекций: различные типы токсинов, факторов адгезии и колонизации. В настоящее время описаны определенные генетические линии и эпидемические клоны данных возбудителей, характерные для разных регионов мира.

В Российской Федерации начиная с 1990-х гг. проводятся исследования, посвященные изучению STEC-штаммов, клинико-эпидемиологическим особенностям и вопросам дифференциальной диагностики инфекций, вызванных данным патотипом эшерихий, а также разработке новых подходов к этиотропной терапии этой группы заболеваний. Однако изучению молекулярно-генетических свойств диареегенных эшерихий уделялось сравнительно мало внимания. В связи с этим актуальным представляется проведение исследований по молекулярно-генетической характеристике выделенных в Российской Федерации штаммов STEC, направленных на изучение генов вирулентности, антибиотикорезистентности, определение их серогрупп и сиквенс-типов штаммов, с целью изучения молекулярно-эпидемиологической ситуации. Кроме того, в последние годы выявляются гибридные патотипы диареегенных эшерихий – энтероаггрегативные геморрагические *E. coli* (EAHEC) и шига-токсин-продуцирующие энтеротоксигенные *E. coli* (STEC/ETEC).

Подробное изучение молекулярно-генетических характеристик патогенных эшерихий определяет возможность новых диагностических и профилактических средств. Наличие универсальной схемы идентификации и субтипирования шига-токсинов имеет важное значение для выявления ассоциаций между подтипами токсина и конкретными клиническими случаями заболевания, а также для оценки риска заражения STEC-инфекцией от сельскохозяйственных животных.

В связи с этим углубленное изучение и всесторонняя микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика патогенных *E. coli*, выделяемых на территории Российской Федерации, является весьма актуальным и важным научным направлением, необходимым для разработки новых методических подходов к их диагностике и лечению, а также для совершенствования эпидемиологического контроля за данными возбудителями.

Литература/References

1. Karch, H Tarr PI, Bielaszewska M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. Int J Med Microbiol. 2005 Oct;295(6-7):405-18. DOI: 10.1016/j.ijmm.2005.06.009
2. Germinario C, Caprioli A, Giordano M, Chironna M, Gallone MS, Tafuri S, et al. Community-wide outbreak of haemolytic uraemic syndrome associated with Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* O26:H11 in southern Italy, summer 2013. Euro Surveill. 2016 Sep 22;21(38). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.38.30343
3. Brooks JT, Sowers EG, Wells JG, Greene KD, Griffin PM, Hoekstra RM, Strockbine NA. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002. J Infect Dis. 2005 Oct 15;192(8):1422-9. DOI: 10.1086/466536
4. De Rauw K, Vincken S, Garabedian L, Levtchenko E, Hubloue I, Verhaegen J, et al. Enteroaggregative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of serotype O104:H4 in Belgium and Luxembourg. New Microbes New Infect. 2014 Sep;2(5):138-43. DOI: 10.1002/nmi2.58
5. EFSA/ECDC. Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* in humans, food and animals in the EU/EEA, with special reference to the German outbreak strain STEC O104. Technical Report of EFSA/ECDC. Available at: http://ecdc.europa.eu/en/publications /Publications/1106_ TER_ EColi_joint_EFSA. pdf.
6. Bielaszewska M, Schiller R, Lammers L, Bauwens A, Fruth A, Middendorf B, et al. Heteropathogenic virulence and phylogeny reveal phased pathogenic metamorphosis in *Escherichia coli* O2:H6. EMBO Mol Med. 2014 Mar;6(3):347-57. DOI: 10.1002/emmm.201303133
7. Griffin MG, Miner PB Jr. Conventional drug therapy in inflammatory bowel disease. Gastroenterol Clin North Am. 1995 Sep;24(3):509-21.
8. Kaper JB, Nataro JP, Molby HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004 Feb;2(2):123-40. DOI: 10.1038/nrmicro818
9. Campellone KG, Robbins D, Leong JM. EspFU is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly. Dev Cell. 2004 Aug;7(2):217-28. DOI: 10.1016/j.devcel.2004.07.004

10. Tobe T, Beatson SA, Taniguchi H, Abe H, Bailey CM, Fivian A, et al. An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Oct 3;103(40):14941-6. DOI: 10.1073/pnas.0604891103
11. Grys TE, Siegel MB, Lathem WW, Welch RA. The StcE protease contributes to intimate adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to host cells. Infect Immun. 2005 Mar;73(3):1295-303. DOI: 10.1128/IAI.73.3.1295-1303.2005
12. Michelacci V, Tozzoli R, Caprioli A, Martínez R, Scheutz F, Grande L, et al. A new pathogenicity island carrying an allelic variant of the Subtilase cytotoxin is common among Shiga toxin producing *Escherichia coli* of human and ovine origin. Clin Microbiol Infect. 2013 Mar;19(3):E149-56. DOI: 10.1111/1469-0691.12122.
13. Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun. 1977 Dec;18(3):775-9.
14. Persson S, Olsen KE, Ethelberg S, Scheutz F. Subtyping method for *Escherichia coli* Shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. J Clin Microbiol. 2007 Jun;45(6):2020-4. DOI: 10.1128/JCM.02591-06
15. Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, et al. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. J Clin Microbiol. 2012 Sep;50(9):2951-63. DOI: 10.1128/JCM.00860-12
16. МУК 4.2.992-00 Методы выделения и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки *E. coli* O157:H7: Методические указания. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2001, 21 с. / MOOK 4.2.992-00 methods for isolation and identification of enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7: Guidelines. Moscow: Federal center of Gossanepidnadzor of the Ministry of health of Russia, 2001, 21 p. (In Russian).
17. O'Sullivan J, Bolton DJ, Duffy G, et al. Methods for Detection and Molecular Characterization of Pathogenic *Escherichia coli* / Pathogenic *E. coli* Network Coordination action food-ct-2006-036256. AFRC, 2007.
18. Gouali M, Ruckly C, Carle I, Lejay-Collin M, Weill FX. Evaluation of CHROMagar STEC and STEC O104 chromogenic agar media for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in stool specimens. J Clin Microbiol. 2013 Mar;51(3):894-900. DOI: 10.1128/JCM.03121-12
19. Bettelheim KA. Studies of *Escherichia coli* cultured on Rainbow Agar O157 with particular reference to enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC). Microbiol Immunol. 1998;42(4):265-9.
20. Zelyas N, Poon A, Patterson-Fortin L, Johnson RP, Lee W, Chui L. Assessment of commercial chromogenic solid media for the detection of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Diagn Microbiol Infect Dis. 2016 Jul;85(3):302-308. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.03.013
21. Karch H, Bielaszewska M, Bitzan M, Schmidt H. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *E. coli* infections. Diagn Microbiol Infect Dis. 1999 Jul;34(3):229-43.
22. Perelle S, Dilasser F, Grout J, Fach P. Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. Mol Cell Probes. 2004 Jun;18(3):185-92. DOI: 10.1016/j.mcp.2003.12.004
23. Wang Q, Ruan X, Wei D, Hu Z, Wu L, Yu T, Feng L, Wang L. Development of a serogroup-specific multiplex PCR assay to detect a set of *Escherichia coli* serogroups based on the identification of their O-antigen geneclusters. Mol Cell Probes. 2010 Oct;24(5):286-90. DOI: 10.1016/j.mcp.2010.06.002
24. EU-RL VTEC_Method_02_Rev_0. Identification and characterization of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) by Real Time PCR amplification of the main virulence genes and the genes associated with the serogroups mainly associated with severe human infections. Режим доступа: http://www.iss.it/binary/vtec/cont/EU_RL_VTEC_Method_02_Rev_0.pdf
25. Liu J, Gratz J, Maro A, Kumburu H, Kibiki G, Taniuchi M, et al. Simultaneous detection of six diarrhea-causing bacterial pathogens with an in-house PCR-luminex assay. J Clin Microbiol. 2012 Jan;50(1):98-103. DOI: 10.1128/JCM.05416-11.
26. Bielaszewska M, Friedrich AW, Aldick T, Schürk-Bulgrin R, Karch H. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. Clin Infect Dis. 2006 Nov 1;43(9):1160-7. DOI: 10.1086/508195
27. Горелов АВ, Бондарева АВ. Стартовая терапия эшерихиозов у детей. Лечение и профилактика. 2016;4(20):69-73. / Gorelov AV, Bondareva AV. The starting therapy of colibacillosis in children. Disease Treatment and Prevention. 2016;4(20):69-73. (In Russian).
28. Кафтырева ЛА, Егорова СА, Макарова МА, Забровская АВ, Сужаева ЛВ, Артамонова ЮА. Вспышки острой кишечной инфекции, вызванные *Escherichia coli* O104:H4, зарегистрированные в странах Европы, и биологические особенности возбудителя. Вестник Санкт-Петербургского университета. 2011;11(4):119-126. / Kaftyreva LA, Egorova SA, Makarova MA, Zabrovskaya AV, Suzhayeva LV, Artamonova YA. Outbreaks of acute enteric infection, caused by *Escherichia coli* O104:H4, reported in the countries of Europe, and biological characteristics of this pathogen. Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. 2011;11(4):119-126. (In Russian).
29. Manning SD, Motiwala AS, Springman AC, Qi W, Lacher DW, Ouellette LM, et al. Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Mar 25;105(12):4868-73. DOI: 10.1073/pnas.0710834105
30. Snedeker KG, Campbell M, Sargeant JM. A systematic review of vaccinations to reduce the shedding of *Escherichia coli* O157 in the faeces of domestic ruminants. Zoonoses Public Health. 2012 Mar;59(2):126-38. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2011.01426.x
31. Smith DR, Moxley RA, Peterson RE, Klopfenstein TJ, Erickson GE, Bretschneider G, et al. A two-dose regimen of a vaccine against type III secreted proteins reduced *Escherichia coli* O157:H7 colonization of the terminal rectum in beef cattle in commercial feedlots. Foodborne Pathog Dis. 2009 Mar;6(2):155-61. DOI: 10.1089/fpd.2008.0136.
32. Smith MJ, Teel LD, Carvalho HM, Melton-Celsa AR, O'Brien AD. Development of a hybrid Shiga holotoxoid vaccine to elicit heterologous protection against Shiga toxins types 1 and 2. Vaccine. 2006 May 8;24(19):4122-9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.02.035
33. Konadu EY, Parke JC Jr, Tran HT, Bryla DA, Robbins JB, Szu SC. Investigational vaccine for *Escherichia coli* O157: phase 1 study of O157 O-specific polysaccharide-Pseudomonas aeruginosa recombinant exoprotein A conjugates in adults. J Infect Dis. 1998 Feb;177(2):383-7.

Информация о соавторе:

Светоч Эдуард Арсеньевич, доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, п. Оболенск, Серпуховский район, Московская область
Телефон: (4967) 36-0079

Information about co-author:

Edward A. Svetoch, Dr. Sci. (Vet.), Professor, Chief research scientist, State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0079

DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-13-17

Бактериология, 2018, том 3, №1, с. 13–17
Bacteriology, 2018, volume 3, No 1, p. 13–17

Времяпролетная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбцией/ионизацией как современный метод анализа микроорганизмов

Д.А.Ковалев, Д.В.Ульшина, И.В.Кузнецова

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь, Российская Федерация

В последнее время для индикации, идентификации и типирования микроорганизмов успешно применяется времяпролетная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) – один из интенсивно развивающихся современных методов анализа органических соединений, в том числе белков. Возможность прямого исследования нелетучих высокомолекулярных соединений широкого диапазона значений масс определила успешное использование метода для изучения белковых экстрактов бактериальных клеток. В обзоре представлены примеры использования MALDI-TOF MS при анализе микроорганизмов и интерпретации полученных данных, определены основные преимущества и недостатки методики.
Ключевые слова: MALDI-TOF MS, белковое профилирование, индикация, идентификация

Для цитирования: Ковалев Д.А., Ульшина Д.В., Кузнецова И.В. Времяпролетная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбцией/ионизацией как современный метод анализа микроорганизмов. Бактериология. 2018; 3(1): 13–17. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-13-17

Time-of-flight mass spectrometry with matrix laser desorption/ionization as a modern method of analysis of microorganisms

D.A.Kovalev, D.V.Ulshina, I.V.Kuznetsova

Stavropol Plague Control Research Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Stavropol, Russian Federation

Recently, time-of-flight mass spectrometry with matrix laser desorption/ionization (MALDI-TOF MS), one of the most sophisticated technologies of modern organic analysis, including proteins, has been successfully used for the indication, identification and typing of microorganisms. The possibility of direct investigation of non-volatile high-molecular compounds. The method successfully used for studying protein extracts of bacterial cells because of possibility of direct investigation of non-volatile high-molecular compounds of a wide range of mass values. The review presents examples of the use of MALDI-TOF MS in the analysis of microorganisms and interpretations, the main advantages and disadvantages of the methodology.
Keywords: MALDI-TOF MS, protein profiling, indication, identification

For citation: Kovalev D.A., Ulshina D.V., Kuznetsova I.V. Time-of-flight mass spectrometry with matrix laser desorption/ionization as a modern method of analysis of microorganisms. Bacteriology. 2018; 3(1): 13–17. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-13-17

Нестабильная обстановка по особо опасным, «возвращающимся» и «новым» инфекциям, реальная угроза биотерроризма актуализируют вопрос внедрения новых методов индикации, идентификации и типирования микроорганизмов I–II групп патогенности и диагностики вызываемых ими болезней [1].

Классические методы лабораторной диагностики патогенных микроорганизмов, основанные на культивировании, изучении особенностей метаболизма и антигенного строения, различной чувствительности к бактериофагам и антибиотикам, отличаются ресурсоемкостью. Данные методы, основанные на изучении фенотипических свойств, имеют некото-

Для корреспонденции:

Ковалев Дмитрий Анатольевич, заведующий лабораторией биохимии ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (8652) 26-0312
E-mail: kovalev_da.stv@list.ru

Статья поступила 27.01.2018 г., принята к печати 30.03.2018 г.

For correspondence:

Dmitry A. Kovalev, researcher, laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare

Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol', 355035, Russian Federation
Phone: (8652) 26-0312
E-mail: kovalev_da.stv@list.ru

The article was received 27.01.2018, accepted for publication 30.03.2018

рые недостатки, связанные с относительной однородностью фенотипических свойств штаммов, что определяет трудности в межвидовой дифференциации микроорганизмов [2–4].

Использование молекулярно-генетических методов исследования способствовало расширению возможностей диагностики инфекционных заболеваний, позволяя осуществлять прямое выявление фрагментов генома возбудителя в исследуемом материале.

Совершенствование лабораторной диагностики инфекционных заболеваний предусматривает, в том числе, разработку новых методов исследования, позволяющих не только выявить, но и охарактеризовать возбудителя инфекционного заболевания.

В настоящее время внедрение времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) в систему индикации, идентификации и типирования патогенных микроорганизмов является актуальным направлением, но требует разработки стандартизированных подходов к пробоподготовке, формированию и оценке масс-спектров, интерпретации полученных результатов, а также подготовки нормативно-методических документов, регламентирующих проведение всех этапов анализа.

MALDI-TOF MS – один из наиболее интенсивно развивающихся современных методов анализа органических соединений, в том числе белков. Возможность прямого исследования молекул массой 1–100 kDa определила успешное применение MALDI-TOF MS для изучения эндогенных и экзогенных низкомолекулярных метаболитов с m/Z (отношение массы иона к заряду) менее 1000 Da. Этой технологией успешно пользовались в течение нескольких десятилетий в химии, в 1975 г. Ангальт и Фенселау [5] впервые предположили, что метод можно применить для исследования бактериальных культур. В подтверждение этого учеными были получены уникальные масс-спектры бактериальных экстрактов для бактерий разных родов. В 1980-х годах развитие технологии десорбции/ионизации, в том числе плазменной десорбции (ПД), лазерной десорбции (ЛД) и бомбардировки быстрыми атомами (ББА), способствовало широкому использованию белкового профилирования с возможностью генерации молекулярных ионов биомаркеров микроорганизмов [6]. Произошедшая в конце 1980-х гг. эволюция видов ионизации, завершившаяся появлением методов MALDI и электрораспыления (ESI), позволила проводить анализ крупных биомолекул, в частности интактных белков [7].

Дальнейшее использование технологии привело к появлению дополнительного этапа на стадии пробоподготовки – предварительной очистки и экстракции бактериальных клеток, предложенного и апробированного группой авторов при исследовании бактерий методом MALDI-TOF MS [8]. Но в 1996 г. Холланд с коллегами впервые опубликовали сообщение о получении спектральных характеристик интактных бактериальных клеток без предварительной обработки перед анализом [9]. Значительно позднее этот подход был использован несколькими исследовательскими группами для идентификации бактерий на уровне рода и вида [10].

Последующее успешное использование метода MALDI-TOF MS для быстрой идентификации микроорганизмов стало возможным благодаря «щадящему» режиму перевода молекул нелетучего высокомолекулярного соединения, нанесенного на мишень, в газовую фазу, преимущественно в виде однозарядных ионов совместно с вспомогательным низкомолекулярным соединением (матрицей) – слабой органической кислотой, имеющей сильное оптическое поглощение в диапазоне длины волны используемого лазера [11].

В качестве матрицы широко используются феруловая (FA) и α-циано-4-гидроксикоричная (CHCA) кислоты, которые наиболее эффективны при обнаружении белковых биомаркеров, 2,5-дигидроксибензойная кислота (DHB) – при исследовании гликопептидов и гликопротеинов, кроме того, описано применение синапиновой (CA) и 2,4-гидроксифенил бензойной кислот [12].

Известно, что присутствие широкого набора сигналов в спектрах бактериальных экстрактов обусловлено наличием рибосомальных белков в исследуемом образце, которые могут быть использованы для идентификации микроорганизмов. Поскольку указанные белки являются высококонсервативными, они могут быть использованы в качестве маркеров для индикации микробов. В свою очередь, обработка масс-спектров и обнаружение белковых маркеров являются ключевыми этапами статистического анализа для интерпретации полученных MS данных.

В настоящее время существуют как минимум три коммерческие платформы для идентификации бактерий и грибов методом MALDI-TOF MS. В двух из них – BioTyper (Bruker Daltonics, Германия) и SARAMIS Vitek-MS (bioMérieux, Франция) идентификация осуществляется путем компьютерного сравнения полученного масс-спектра с архивированными в базах данных супер-спектрами или основными спектрами, генерированными при повторной масс-спектрометрии набора штаммов или типового штамма определенного вида. Третья платформа – Andromas (Andromas SAS, Франция), в базе данных которой заложены множественные видоспецифичные спектральные профили каждого микроорганизма. Указанные приборные линии содержат собственные идентификационные базы, включающие референсные масс-спектрометрические профили большого количества микроорганизмов. Все три платформы являются открытыми, пользователь может пополнять базу собственными данными [13], что важно при исследовании возбудителей природно-очаговых (ПОИ) и особо опасных инфекций (ООИ), спектры которых в коммерческих базах данных отсутствуют. По этой причине в результате видовой идентификации в среде платформы Biotyper (Bruker Daltonics, Германия) с использованием программы FlexAnalysis 3.0 и референс-библиотеки 3.0 возбудитель сибирской язвы в вегетативной форме определяется как «вероятный *Bacillus cereus*» [14].

Таким образом, опыт успешного применения масс-спектрометрического анализа в исследовании бактериальных экстрактов способствовал интеграции метода MALDI-TOF MS в систему традиционных схем индикации и идентификации микроорганизмов в ряде зарубежных стран [15–17]. Описано прямое определение методом MALDI-TOF MS наличия спор сибиреязвенного микроба в подозрительных порошках, содержащих ржаную и пшеничную муку, сухое молоко [18]. В российских литературных источниках показаны примеры успешного применения метода MALDI-TOF MS для индикации, идентификации возбудителей чумы [18, 19], сибирской язвы [20], бруцеллеза [21], холеры и других мик-

роорганизмов рода *Vibrio*, туляремии [22], лептоспироза [23], сапа и мелиоидоза [24].

За последнее десятилетие наблюдается расширение области применения метода MALDI-TOF MS, включающей не только протеомный анализ для картирования белков в научных целях, но и клиническую лабораторную диагностику на основании выявления на белковых профилях микробной клетки групп специфичных фрагментов [25]. Одно из наиболее востребованных направлений – изучение возможности применения MALDI-TOF MS для выявления возбудителей инфекционных болезней в клинических образцах без этапа выделения чистой культуры на стадии пробоподготовки [26]. Однако отсутствие регламентированных методик обеззараживания и подготовки исследуемого нативного материала, а также доступного программного обеспечения для анализа образцов является основной причиной относительно низкой воспроизводимости результатов масс-спектрометрии [27]. В результате серии экспериментальных MALDI-TOF MS исследований клинического материала, подозрительного на присутствие возбудителя инфекции, были получены ложноотрицательные результаты, что может быть связано с низкой концентрацией возбудителя в материале [28]. Сложность интерпретации полученных данных при анализе клинических образцов обусловлена существенной вариабельностью качественного и количественного состава белковых профилей, полученных от различных индивидуумов. В качестве эффективного решения указанной проблемы исследователями предложены различные способы предварительной подготовки проб: концентрирование, фракционирование, удаление мажорных фракций белков, селективное удаление небелковых примесей и др. [29].

Как и все методы лабораторной диагностики, MALDI-TOF MS обладает рядом преимуществ и недостатков. Безусловно, относительно низкая стоимость пробоподготовки, высокая производительность и скорость анализа позволят в дальнейшем определить место универсальной платформы MALDI-TOF MS в системе лабораторных исследований [30]. К основным ограничениям применения современной MALDI-TOF масс-спектрометрии можно отнести отсутствие в доступных коммерческих базах данных информации о штаммах возбудителей ПОИ и ООИ, необходимость работы с чистыми культурами возбудителя в экспоненциальной фазе роста колонии, влияние условий и времени культивирования микроорганизма, недостаточную точность межвидовой дифференциации близкородственных микроорганизмов [31]. Весомым недостатком является невозможность полноценной идентификации возбудителей, присутствующих в нативном материале и смешанных культурах, что может быть вызвано не принципиальным ограничением самого метода, а несовершенством алгоритма интерпретации полученных результатов. В настоящее время существуют различные алгоритмы анализа данных [32–34]: как общедоступные, например, статистическое программное обеспечение R [https://cran.r-project.org/], Mass-Up [http://sing.ei.uvigo.es], библиотеки Java [https://java.com], так и лицензированные – пакеты Matlab [https://matlab. ru], обладающие рядом преимуществ и недостатков.

Учитывая вышесказанное, разработка и внедрение комплексных схем индикации и идентификации патогенных микроорганизмов, основанных на оценке степени сходства масс-спектра образца с референсными спектрами из базы данных (значения score), и одновременное выявление родо-, видо- и штаммоспецифичных биомаркеров конкретного патогена, позволят значительно расширить возможности практического использования технологии MALDI-TOF MS как в экспериментальных, так и в диагностических целях.

Для полноценного использования метода необходимо особое внимание уделить не только созданию информативных электронных баз данных, но и разработке соответствующего программного обеспечения (ПО) – общедоступных универсальных программ с графическим интерфейсом, удобных для пользователя и не требующих навыков программирования [35]. Разработка единого универсального ПО позволит обеспечить поиск и выявление аналитически значимых сигналов (биомаркеров), возможность использования различных алгоритмов кластеризации объектов анализа, классификацию большого массива данных с построением трехмерной визуализации.

В настоящее время перспективным направлением для поиска биомаркеров, проведения классификации в автоматическом режиме, построения кластерных диаграмм являются статистические подходы в сочетании с методами машинного обучения [36].

Литература

1. Куличенко АН, Кутырев ВВ, Таран АВ. Проблемные вопросы развития молекулярной диагностики опасных инфекций. VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2010». Т. 1, с. 397-400.
2. Dixon P, Davies P, Hollingworth W, Stoddart M, MacGowan A. A systematic review of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry compared to routine microbiological methods for the time taken to identify microbial organisms from positive blood cultures. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015 May;34(5):863-76. DOI: 10.1007/s10096-015-2322-0
3. Kazemi S, Borzoueisileh S, Ebrahimpour S. Evaluation of Brucellosis in Patients and Diagnostic Tests. Online J Anim Feed Res. 2015;4(3):60-6.
4. Patel R. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. Clin Chem. 2015 Jan;61(1):100-11. DOI: 10.1373/clinchem.2014.221770
5. Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. Anal Chem. 1975;47:219-25.
6. Heller DN, Cotter RJ, Fenselau C, Uy OM. Profiling of bacteria by fast atom bombardment mass spectrometry. Anal Chem. 1987 Dec 1;59(23):2806-9.
7. Tanaka K, Fenn JB. (2002) Nobel Laureates in chemistry. Available at: http://www.nobelprize.org (accessed 30.03.2018)
8. Cain TC, Lubman DM, Webber WJ. Differentiation of bacteria using protein profiles from MALDI-TOF/MS. Rapid Commun Mass Spectrom. 1994;8:1026-30.
9. Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, Lay JO. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrixassisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 1996;10(10):1227-32.
10. Nagy E, Maier T, Urban E, Terhes G, Kostrzewa M. Species identification of clinical isolates of Bacteroides by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Microbiol Infect. 2009 Aug;15(8):796-802. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02788.x
11. Wilkins CL, Lay JO. Identification of microorganisms by mass-spectrometry. Wiley-Blackwell; 2006, 376 p.
12. Giebel R, Worden C, Rust SM, Kleinheinz GT, Robbins M, Sandrin TR. Microbial fingerprinting using matrixassisted laser desorption ionization time-of-flight mass

spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. Adv Appl Microbiol. 2010;71:149-84. doi: 10.1016/S0065-2164(10)71006-6

13. Clark A, Kaleta E, Arora A, Wolk DM. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. Clin Microbiol Rev. 2013 Jul;26(3):547-603. DOI: 10.1128/CMR.00072-12
14. Blaschitz M, Meidlinger L, Sagel U, Wewalka G, Allerberger F, Indra A. Detection of highly pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Vienna, Austria, 10 – 13 April 2010. – Abstract number: P1773.
15. Lasch P, Wahab T, Weil S, Pályi B, Tomaso H, Zange S, et al. Identification of highly pathogenic microorganisms by matrix-assisted laser desorption Ionization-time of flight mass spectrometry: Results of an interlaboratory ring trial. J Clin Microbiol. 2015 Aug;53(8):2632-40. DOI: 10.1128/JCM.00813-15
16. Sandalakis V, Goniotakis I, Vranakis I, Chochlakis D, Psaroulaki A. Use of MALDI-TOF mass spectrometry in the battle against bacterial infectious diseases: recent achievements and future perspectives. Expert Rev Proteomics. 2017 Mar;14(3):253-267. DOI: 10.1080/14789450.2017.1282825.
17. Sokhna C, Gaye O, Doumbo O. developing research in infectious and tropical diseases in Africa: the paradigm of Senegal. Clin Infect Dis. 2017 Aug 15;65(suppl_1):S64-S69. DOI: 10.1093/cid/cix347.
18. Dybwad M, van der Laaken AL, Blatny JM, Paauwc A. Rapid Identification of *Bacillus anthracis* Spores in Suspicious Powder Samples by Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Appl Environ Microbiol. 2013 Sep;79(17):5372-83. DOI: 10.1128/AEM.01724-13
19. Спицын АН, Уткин ДВ, Щербакова НЕ, Портенко СА, Абдрашитова АС, Касьян ИА, и др. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ штаммов возбудителя чумы. Проблемы особо опасных инфекций. 2016;2:91-4. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-91-94
20. Еременко ЕИ, Воропаев ВВ, Котенева ЕА, Рязанова АГ, Аксенова ЛЮ, Цыганкова ОИ, и др. Разработка метода анализа единичных нуклеотидных полиморфизмов *Bacillus anthracis* с использованием минисеквенирования и масс-спектрометрии. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2016;11(4):565-8. DOI: 10.14300/mnnc.2016.11135
21. Ульшина ДВ, Ковалев ДА, Бобрышева ОВ, Лямкин ГИ, Худолеев АА, Сирица ЮВ, Куличенко АН. Разработка алгоритма идентификации культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Проблемы особо опасных инфекций. 2015;4:96-9.
22. Афанасьев МВ, Миронова ЛВ, Балахонов СВ. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ для идентификации возбудителей чумы, холеры и туляремии. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2015;2:3-8.
23. Зуева ЕВ, Стоянова НА, Токаревич НК, Арег АТ. Типирование изолятов лептоспир методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Инфекция и иммунитет. 2016;6(3):33.
24. Лопастейская ЯА, Молчанова ЕВ, Шаров ТН, Кузютина ЮА, Захарова ИБ, Викторов ДВ, Топорков АВ. Применение времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза. Клиническая лабораторная диагностика. 2016;61(8):502-7. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-8-502-507
25. Cho YT, Su H, Huang TL, Chen HC, Wu WJ, Wu PC, Wu DC, Shiea J. Matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry for clinical diagnosis. Clin Chim Acta. 2013 Jan 16;415:266-75. DOI: 10.1016/j.cca.2012.10.032.
26. Ferreira L, Vega Castaño S, Sánchez-Juanes F, González-Cabrero S, Menegotto F, Orduña-Domingo A, et al. Identification of Brucella by MALDI-TOF Mass Spectrometry. Fast and Reliable Identification from Agar Plates and Blood Cultures. PLoS One. 2010 Dec 6;5(12):e14235. DOI: 10.1371/journal.pone.0014235
27. Baranov AA, Mayanskii AN, Mayanskii NA. A new epoch in medical microbiology. Herald of the Russian Academy of Sciences. 2015;85(6):515-22.
28. Yonetani S, Ohnishi H, Ohkusu K, Matsumoto T, Watanabe T. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house saponin method. Int J Infect Dis. 2016 Nov;52:37-42. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.09.014
29. Šedo O, Sedláček I, Zdráhal Z. Sample preparation methods for MALDI-MS profiling of bacteria. Mass spectrometry reviews. 2011;30(3):417-34.
30. Fournier PE, Drancourt M, Colson P, Rolain JM, La Scola B, Raoult D. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. Nat Rev Microbiol. 2013 Aug;11(8):574-85.
31. Theel E. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Bacterial and Yeast Isolates. Communique Mayo Medical Laboratories. – 2013.
32. López-Fernández H, Santos HM, Capelo JL, Fdez-Riverola F, Glez-Peña D, Reboiro-Jato M. Mass-Up: an all-in-one open software application for MALDI-TOF mass spectrometry knowledge discovery. BMC Bioinformatics. 2015 Oct 5;16:318. DOI: 10.1186/s12859-015-0752-4.
33. Scott NE, Brown LM, Kristensen AR, Foster LJ. Development of a computational framework for the analysis of protein correlation profiling and spatial proteomics experiments. J Proteomics. 2015 Apr 6;118:112-29. DOI: 10.1016/j.jprot.2014.10.024
34. Oveland E, Muth T, Rapp E, Martens L, Berven FS, Barsnes H. Viewing the proteome: How to visualize proteomics data? Proteomics. 2015 Apr;15(8):1341-55. DOI: 10.1002/pmic.201400412
35. Croxatto A, Prodhom G, Greub G. Applications of MALD I-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS Microbiol Rev. 2012 Mar;36(2):380-407. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x.
36. Swan AL, Mobasheri A, Allaway D, Liddell S, Bacardit J. Application of machine learning to proteomics data: classification and biomarker identification in postgenomics biology. OMICS. 2013 Dec;17(12):595-610. DOI: 10.1089/omi.2013.0017.

References

1. Kulichenko AN, Kutyrev VV, Taran AV. Problematic issues of development of molecular diagnostics of dangerous infections. VII all-Russian Scientific and Practical Conference with international participation "Molecular diagnostics 2010". Vol. 1, pp. 397-400. (In Russian).
2. Dixon P, Davies P, Hollingworth W, Stoddart M, MacGowan A. A systematic review of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry compared to routine microbiological methods for the time taken to identify microbial organisms from positive blood cultures. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015 May;34(5):863-76. DOI: 10.1007/s10096-015-2322-0.
3. Kazemi S, Borzoueisileh S, Ebrahimpour S. Evaluation of Brucellosis in Patients and Diagnostic Tests. Online J Anim Feed Res. 2015;4(3):60-6.
4. Patel R. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. Clin Chem. 2015 Jan;61(1):100-11. DOI: 10.1373/clinchem.2014.221770
5. Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. Anal Chem. 1975;47:219-25.
6. Heller DN, Cotter RJ, Fenselau C, Uy OM. Profiling of bacteria by fast atom bombardment mass spectrometry. Anal Chem. 1987 Dec 1;59(23):2806-9.
7. Tanaka K, Fenn JB. (2002) Nobel Laureates in chemistry. Available at: http://www.nobelprize.org (accessed 30.03.2018)
8. Cain TC, Lubman DM, Webber WJ. Differentiation of bacteria using protein profiles from MALDI-TOF/MS. Rapid Commun Mass Spectrom. 1994;8:1026-30.
9. Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, Lay JO. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrixassisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 1996;10(10):1227-32.
10. Nagy E, Maier T, Urban E, Terhes G, Kostrzewa M. Species identification of clinical isolates of Bacteroides by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-

flight mass spectrometry. Clin Microbiol Infect. 2009 Aug;15(8):796-802. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02788.x.

11. Wilkins CL, Lay JO. Identification of microorganisms by mass-spectrometry. Wiley-Blackwell; 2006, 376 p.
12. Giebel R, Worden C, Rust SM, Kleinheinz GT, Robbins M, Sandrin TR. Microbial fingerprinting using matrixassisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. Adv Appl Microbiol. 2010;71:149-84. doi: 10.1016/S0065-2164(10)71006-6
13. Clark A, Kaleta E, Arora A, Wolk DM. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. Clin Microbiol Rev. 2013 Jul;26(3):547-603. DOI: 10.1128/CMR.00072-12
14. Blaschitz M, Meidlinger L, Sagel U, Wewalka G, Allerberger F, Indra A. Detection of highly pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Vienna, Austria, 10 – 13 April 2010. – Abstract number: P1773.
15. Lasch P, Wahab T, Weil S, Pályi B, Tomaso H, Zange S, et al. Identification of highly pathogenic microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: Results of an interlaboratory ring trial. J Clin Microbiol. 2015 Aug;53(8):2632-40. DOI: 10.1128/JCM.00813-15
16. Sandalakis V, Goniotakis I, Vranakis I, Chochlakis D, Psaroulaki A. Use of MALDI-TOF mass spectrometry in the battle against bacterial infectious diseases: recent achievements and future perspectives. Expert Rev Proteomics. 2017 Mar;14(3):253-267. DOI: 10.1080/14789450.2017.1282825.
17. Sokhna C, Gaye O, Doumbo O. developing research in infectious and tropical diseases in Africa: the paradigm of Senegal. Clin Infect Dis. 2017 Aug 15;65(suppl_1):S64-S69. DOI: 10.1093/cid/cix347.
18. Dybwad M, van der Laaken AL, Blatny JM, Paauwc A. Rapid Identification of *Bacillus anthracis* Spores in Suspicious Powder Samples by Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Appl Environ Microbiol. 2013 Sep;79(17):5372-83. DOI: 10.1128/AEM.01724-13
19. Spitsyn AN, Utkin DV, Shcherbakova NE, Portenko SA, Abdrashitova AS, Kas'yan IA, et al. MALDI-TOF Mass-Spectrometry Analysis of Plague Agent Strains. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2016;2:91-4. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-91-94 (In Russian).
20. Eremenko EI, Voropayev VV, Kotenyova EA, Ryazanova AG, Aksyonova LYu, Tsygankova O, et al. Development of the method for analysis of *Bacillus anthracis* single nucleotide polymorphisms using the mini sequensing and mass spectrometry. Medical news of the North Caucasus. 2016;11(4):565-8. DOI: 10.14300/mnnc.2016.11135 (In Russian).
21. Ul'shina DV, Kovalev DA, Bobrysheva OV, Lyamkin GI, Khudoleev AA, Siritsa YuV, Kulichenko AN. Development of Algorithm for Identification of Brucellosis Agent Cultures Using MALDI-TOF Mass-Spectrometry. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2015;4:96-9. (In Russian).
22. Afanas'ev MV, Mironova LV, Balakhonov SV. MALDI-ToF mass spectrometric analysis for the identification of plague, cholera, and tularemia causative agents. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2015;30(2):57-63.
23. Zueva EV, Stoyanova NA, Tokarevich NK, Areg AT. Tipirovanie izolyatov leptospir metodom MALDI-TOF mass-spektrometrii. Russian Journal of Infection and Immunity. 2016;6(3):33. (In Russian).
24. Lopasteiskaya YaA, Molchanova EV, Sharov TN, Kuziutina YuA, Zakharova IB, Victorov DV, Toporkov AV. The application of time-of-flight mass spectrometry with matrix activated laser desorption-ionization (MALDI-ToF) for identifying agents of glanders and melioidosis. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2016;61(8):502-7. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-8-502-507 (In Russian).
25. Cho YT, Su H, Huang TL, Chen HC, Wu WJ, Wu PC, Wu DC, Shiea J. Matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry for clinical diagnosis. Clin Chim Acta. 2013 Jan 16;415:266-75. DOI: 10.1016/j.cca.2012.10.032.
26. Ferreira L, Vega Castaño S, Sánchez-Juanes F, González-Cabrero S, Menegotto F, Orduña-Domingo A, et al. Identification of Brucella by MALDI-TOF Mass Spectrometry. Fast and Reliable Identification from Agar Plates and Blood Cultures. PLoS One. 2010 Dec 6;5(12):e14235. DOI: 10.1371/journal.pone.0014235
27. Baranov AA, Mayanskii AN, Mayanskii NA. A new epoch in medical microbiology. Herald of the Russian Academy of Sciences. 2015;85(6):515-22.
28. Yonetani S, Ohnishi H, Ohkusu K, Matsumoto T, Watanabe T. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house saponin method. Int J Infect Dis. 2016 Nov;52:37-42. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.09.014
29. Šedo O, Sedláček I, Zdráhal Z. Sample preparation methods for MALDI-MS profiling of bacteria. Mass spectrometry reviews. 2011;30(3):417-34.
30. Fournier PE, Drancourt M, Colson P, Rolain JM, La Scola B, Raoult D. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. Nat Rev Microbiol. 2013 Aug;11(8):574-85.
31. Theel E. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Bacterial and Yeast Isolates. Communique Mayo Medical Laboratories. – 2013.
32. López-Fernández H, Santos HM, Capelo JL, Fdez-Riverola F, Glez-Peña D, Reboiro-Jato M. Mass-Up: an all-in-one open software application for MALDI-TOF mass spectrometry knowledge discovery. BMC Bioinformatics. 2015 Oct 5;16:318. DOI: 10.1186/s12859-015-0752-4.
33. Scott NE, Brown LM, Kristensen AR, Foster LJ. Development of a computational framework for the analysis of protein correlation profiling and spatial proteomics experiments. J Proteomics. 2015 Apr 6;118:112-29. DOI: 10.1016/j.jprot.2014.10.024
34. Oveland E, Muth T, Rapp E, Martens L, Berven FS, Barsnes H. Viewing the proteome: How to visualize proteomics data? Proteomics. 2015 Apr;15(8):1341-55. DOI: 10.1002/pmic.201400412
35. Croxatto A, Prodhom G, Greub G. Applications of MALD I-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS Microbiol Rev. 2012 Mar;36(2):380-407. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x.
36. Swan AL, Mobasheri A, Allaway D, Liddell S, Bacardit J. Application of machine learning to proteomics data: classification and biomarker identification in postgenomics biology. OMICS. 2013 Dec;17(12):595-610. DOI: 10.1089/omi.2013.0017.

Информация о соавторах:

Ульшина Диана Васильевна, младший научный сотрудник лаборатории биохимии ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 355000, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (8652) 26-0312
E-mail: vladidiana@yandex.ru

Кузнецова Ирина Владимировна, врач-бактериолог лаборатории биохимии ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 355000, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (8652) 26-0312
E-mail: labindic@mail.ru

Information about co-authors:

Diana V. Ul'shina, researcher, laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol', 355035, Russian Federation
Phone: (8652) 26-0312
E-mail: vladidiana@yandex.ru

Irina V. Kuznetzova, researcher, laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol', 355035, Russian Federation
Phone: (8652) 26-0312
E-mail: labindic@mail.ru

Бактериология, 2018, том 3, №1, с. 18–21
Bacteriology, 2018, volume 3, No 1, p. 18–21

DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-18-21

Новый штамм *Serratia* sp. ASf1, растущий при высоких концентрациях железа

Г.В.Хохлова, Т.В.Антипова, И.Ю.Филатова, А.Н.Звонарёв, Т.В.Кулаковская, М.Б.Вайнштейн

ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина» РАН, Пущино, Московская область, Российская Федерация

Из низкотемпературного природного источника, богатого гематитом, выделен штамм Asf1, отнесенный к роду *Serratia*, для которого авторы показали способность к росту при высоких концентрациях растворенного железа (5 мМ), отсутствие при этом у клеток сидерофор и обильное отложение бактериями неорганизованных внеклеточных окисленных форм железа (III).
Ключевые слова: микроаэрофилы, Serratia, трансформация железа (III)

Для цитирования: Хохлова Г.В., Антипова Т.В., Филатова И.Ю., Звонарев А.Н., Кулаковская Т.В., Вайнштейн М.Б. Новый штамм *Serratia* sp. ASf1, растущий при высоких концентрациях железа. Бактериология. 2018; 3(1): 18–21. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-18-21

A new strain of *Serratia* sp. ASf1, growing at high iron concentrations

G.V.Khokhlova, T.V.Antipova, I.Yu.Filatova, A.N.Zvonarev, T.V.Kulakovskaya, M.B.Vainshtein

Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino, Moscow region, Russian Federation

The strain Asf1 was isolated from the low-temperature natural spring, rich in hematite. The strain is referred by the authors to the genus *Serratia*. This strain is capable of growth at high concentrations of dissolved iron (5 mM), the absence of siderophore in the cells and abundant deposition of unorganized extracellular oxidized forms of iron (III) by the bacteria.
Keywords: microaerophiles, Serratia, transformation of iron (III)

For citation: Khokhlova G.V., Antipova T.V., Filatova I.Yu., Zvonarev A.N., Kulakovskaya T.V., Vainshtein M.B. A new strain of *Serratia* sp. ASf1, growing at high iron concentrations. Bacteriology. 2018; 3(1): 18–21. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-18-21

Известны бактерии, трансформирующие соединения железа и переносящие их высокие концентрации. Большинство таких бактерий высокоспецифичны, например, ацидофильные серо- и железоокисляющие *Acidithiobacillus ferrooxidans* и *Leptospirillum ferrooxidans*, анаэробные восстанавливающие железо *Geobacter*. Вместе с этим значительный интерес представляют неспециализированные факультативные анаэробы, способные к трансформации соединений железа в богатых им почвах, в том числе – в условиях заводнения почв со снижением аэрирования. Известным и малоизученным примером таких бактерий являются представители рода *Serratia* [1].

Цель данной работы – выделение и идентификация бактерий, участвующих в образовании окисленных форм железа и способных к росту при больших концентрациях железа (III) в аэробных и микроаэрофильных условиях.

Материалы и методы

Источник выделения штамма. Пробы отбирали на территории государственного геологического памятника природы в Терском районе Мурманской области в августе 2017 г. (рис. 1). Наличие лимонита и гематита придает песчаникам, возраст которых около 1 млрд лет, характерную красновато-шоколадную окраску [2]. Стерильным шприцом из ручья отбирали образец воды, закапывали в стерильную пробирку Хангейта с заранее приготовленной питательной средой следующего состава (г/л): KH_2PO_4 0,1 г, $MgSO_4 \times 7H_2O$ 0,15 г, K_2HPO_4 0,1 г,

Для корреспонденции:
Хохлова Галина Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории физиологии микроорганизмов ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов» РАН
Адрес: 142290, Московская область, Серпуховский р-н, г. Пущино, пр-кт Науки, 5
Телефон: (4967) 73-2540
E-mail: galka889@gmail.com

Статья поступила 17.01.2018 г., принята к печати 30.03.2018 г.

For correspondence:
Galina V. Khokhlova, junior researcher of laboratory physiology of microorganisms, Skryabin Institute of biochemistry and physiology of microorganisms RAS
Address: 5 Nauki Ave., Pushchino, Serpukhov district, Moscow region, 142290, Russian Federation
Phone: (4967) 73-2540
E-mail: galka889@gmail.com

The article was received 17.01.2018, accepted for publication 30.03.2018

Таблица 1. **Использованные праймеры**

27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492R	ACGGYTACCTTGTTACGACTT

$NaNO_3$ 0,34 г, дрожжевой экстракт, пептон 3 г, L-лактат калия 27 мМ без цитрата железа, pH 6,5–7,0 (среда FSM) [3].

Культивирование. Выделение и основное культивирование после выделения в чистую культуру проводили на полной среде FSM (цитрат Fe (III) от 100 мкМ до 5 мМ) при 25°C.

Молекулярно-генетические методы. Для идентификации штамма тотальную ДНК из клеток выделяли стандартным фенол-хлороформным методом по Мармуру [4] с предварительным трехкратным замораживанием и оттаиванием осажденных клеток. Далее проводили ПЦР с универсальными бактериальными праймерами (табл. 1). Секвенирование 16s рРНК гена проводили в компании «Евроген». Далее последовательность анализировали, проводили поиск родственных штаммов через NCBI Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides).

Анализ сидерофоров. Поиск метаболитов, реагирующих с трехвалентным железом, проводили после культивирования штамма на среде FSM без цитрата железа (III) согласно методике, описанной в ранней работе коллег [5]. Супернатант культуральной жидкости трижды экстрагировали хлороформом при pH = 3 в соотношении 1 : 1. Хлороформный экстракт упаривали досуха на роторном испарителе. Полученный осадок анализировали с помощью ТСХ на пластинках силикагеля (Silica gel F_{254}, Merck, Германия) в системе хлороформ – метанол – 25% NH_4OH (90 : 10 : 0.1) и (80 : 20 : 0.2). Хроматограммы опрыскивали 5%-м раствором $FeCl_3$ в метаноле (реактив на фенольные соединения), далее анализировали под ультрафиолетом.

Флуоресцентная микроскопия. Флуоресцентную микроскопию использовали для визуализации полифосфатов с флуорохромом 4′,6′-диамино-2-фенилиндол 2 HCl (DAPI; Sigma, USA) [6–9]. Клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин с DAPI (10 мкг/мл). Затем образцы анализировали на флуоресцентном фазово-контрастном микроскопе (AXIO Imager A1, Zeiss, Germany) с фильтром 49 (Zeiss), с максимумом возбуждения 359 нм и максимумом излучения 460 нм.

Рис. 1. **Лодочный ручей (Терский р-н Мурманской обл.), место отбора проб.**

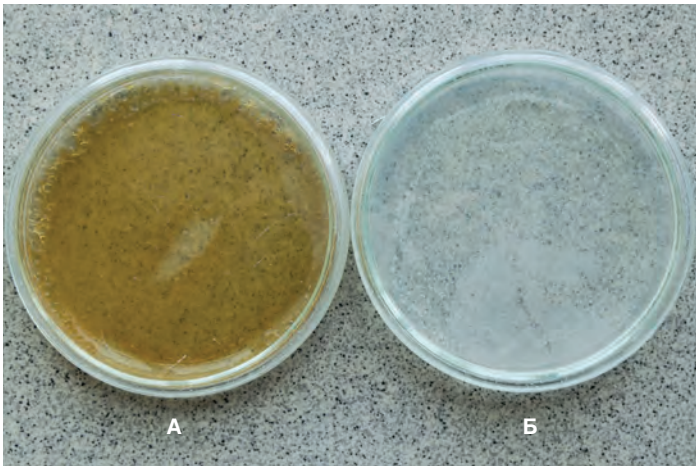
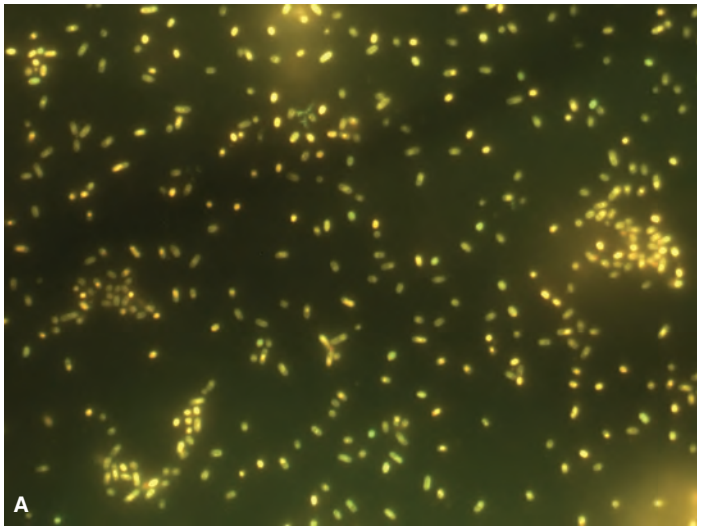


Рис. 2. **Фото чашек с 5 мМ железом (А) и без (Б).**



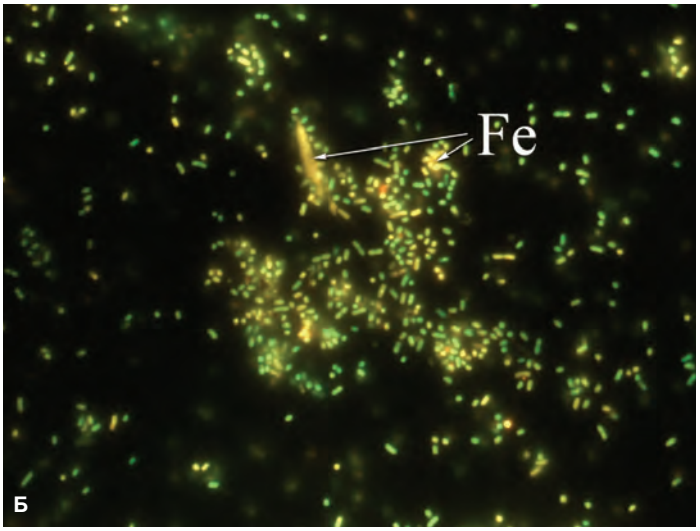


Рис. 3. **Отложение полифосфатов в клетках *Serratia* sp. Asf1 при флуоресцентной микроскопии с окраской DAPI.** А – в среде без Fe (III); Б – в среде с Fe (III).

Таблица 2. **Ближайшие родственники, согласно NCBI Blast**

Название родственного штамма	Сходство, %	Типовой номер
S. quinivorans strain 4364, 16S рРНК ген	97	NR_037112.1
S. proteamaculans штамм DSM 4543, 16S рРНК ген	97	NR_025341.1
S. grimesii штамм DSM 30063, 16S рРНК ген	97	NR_025340.1
S. liquefaciens штамм ATCC 27592, 16S рРНК ген	96	NR_025339.1
S. entomophila штамм DSM 12358, 16S рРНК ген	96	NR_025338.1
S. fonticola штамм DSM 4576, 16S рРНК ген	96	NR_025339.1

Результаты и обсуждение

Из природного образца была выделена культура, способная расти при высоких концентрациях железа: в присутствии в среде 5 мМ цитрата Fe(III). Выделенная чистая культура, штамм Asf1, по морфологии, культуральным признакам и по результатам секвенирования 16s рРНК гена отнесена к роду *Serratia* (табл. 2).

Согласно проведенной хлороформной экстракции, сидерофоры не были визуализированы, из чего можно предположить, что отложение окисного железа в колониях бактерий, приобретающих рыжий цвет ржавого железа (рис. 2), является неспецифической защитной реакцией выделенного штамма к большому количеству окисленного железа в окружающей среде. Отложение аморфных хлопьев железа в скоплениях клеток было подтверждено микроскопией.

Флуоресцентная микроскопия после окраски DAPI показала, что обильное образование полифосфатов в клетках происходило в условиях без Fe (III) и, возможно, подавлялось внесением цитрата Fe (III) (рис. 3).

Роль бактерий, способных трансформировать соединения железа, важна в глобальном круговороте железа, в том числе – в образовании железных руд и переотложении соединений железа в почве. Изучение физиологии и биохимии «железобактерий» в общем понимании этого термина актуально как для фундаментальной микробиологии, так и для развития геобиотехнологий, для защиты трубопроводов от коррозии и для биоремедиации почв. Формы железа и их подвижность имеют большое значение для почвы и растений, поэтому в перспективе возможно создание бакпрепаратов для ремедиации почв с высоким содержанием железа. Известно, что многие почвенные и водные микроорганизмы могут применяться для биоремедиации почв от тяжелых металлов, в том числе и относящиеся к роду *Serratia* [9, 10]. Бактерии рода *Serratia* особенно перспективны для заводняемых почв, так как являются факультативными анаэробами – эти же свойства факультативного анаэроба и переотложения железа демонстрирует выделенный нами штамм *Serratia* sp. Asf1, что подтверждает возможность его использования для биоремедиации в присутствии высоких концентраций железа.

Заключение

Из низкотемпературного природного источника, богатого гематитом, выделена микроаэрофильная бактерия штамм Asf1, отнесенная к роду *Serratia*, для которой показаны способность к росту при высоких концентрациях растворенного железа (5 мМ), отсутствие сидерофор и обильное отложение неорганизованных внеклеточных окисленных форм железа (III). Предполагается, что штамм может быть использован для биоремедиации почв с высоким содержанием железа.

Литература

1. Thorpe C, Morris K, Boothman C, Lloyd J. Alkaline Fe (III) reduction by a novel alkali-tolerant *Serratia* sp. isolated from surface sediments close to Sellafield nuclear facility. FEMS Microbiol Lett. 2012 Feb;327(2):87-92. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2011.02455.x.
2. Жиров ДВ, Пожиленко ВИ, Белкина ОА, Костина ВА, Королева НЕ, Константинова НА, и др. Терский район (серия «Памятники природы и достопримечательности Мурманской области»). Издание 2-е, исправленное и дополненное. СПб.: Ника, 2006, 128 с.
3. Heyen U., Schuler D. Growth and magnetosome formation by microaerophilic *Magnetospirillum* strains in an oxygen-controlled fermentor. Appl Microbiol Biotechnol. 2003 Jun;61(5-6):536-44. DOI: 10.1007/s00253-002-1219-x
4. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. Journal of Molecular Biology. 1961;3(2): 208-18.
5. Козловский АГ, Антипова ТВ, Желифонова ВП, Баскунов БП, Иванушкина НЕ, Кочкина ГА, Озерская СМ. Вторичные метаболиты грибов секции Usti рода *Aspergillus* и их использование в хемосистематике. Микробиология. 2017;86 (2):164-71. DOI: 10.7868/S0026365617020112
6. Serafim L, Lemos O, Levantesi C, Tandoi V, Santos H, Reis MA. Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms. J Microbiol Meth. 2002;51(1):1-18.
7. Pavlov E, Aschar-Sobbi R, Campanella M, Turner RJ, Gómez-García MR, Abramov AY. Inorganic polyphosphate and energy metabolism in mammalian cells. J Biol Chem. 2010 Mar 26;285(13):9420-8. DOI: 10.1074/jbc.M109.013011
8. Ryazanova L, Andreeva N, Kulakovskaya T, Valiakhmetov A, Yashin V, Vagabov V, Kulaev I. The early stage of polyphosphate accumulation in Saccharomyces cerevisiae: comparative study by extraction and DAPI staining. Adv Biosci Biotechnol. 2011;2(04):293-7.
9. Martin P, Van Mooy BA. Fluorometric quantification of polyphosphate in environmental plankton samples: extraction protocols, matrix effects, and nucleic acid interference. Appl Environ Microbiol. 2013 Jan;79(1):273-81. DOI: 10.1128/AEM.02592-12
10. Young Y, Cerniglia C. (eds.). Microbiological Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals, In L. Y. Young and C. E. Cerniglia (eds.), Microbiological Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals, Wiley-Liss, New York. (1995) pp. 301-324.

References

1. Thorpe C, Morris K, Boothman C, Lloyd J. Alkaline Fe (III) reduction by a novel alkali-tolerant *Serratia* sp. isolated from surface sediments close to Sellafield nuclear facility. FEMS Microbiol Lett. 2012 Feb;327(2):87-92. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2011.02455.x.
2. Zhirov DV, Pozhilenko VI, Belkina OA, Kostina VA, Koroleva NE, Konstantinova NA, et al. Terskii raion (seriya «Pamyatniki prirody i dostoprimechatel'nosti Murmanskoi oblasti»). Izdanie 2nd edition. St. Petersburg: "Nika", 2006, 128 p. (In Russian).
3. Heyen U., Schuler D. Growth and magnetosome formation by microaerophilic *Magnetospirillum* strains in an oxygen-controlled fermentor. Appl Microbiol Biotechnol. 2003 Jun;61(5-6):536-44. DOI: 10.1007/s00253-002-1219-x
4. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. Journal of Molecular Biology. 1961;3(2): 208-18.
5. Kozlovskii AG, Antipova TV, Zhelifonova VP, Baskunov BP, Ivanushkina NE, Kochkina GA, Ozerskaya SM. Secondary metabolites of fungi of the Usti section, genus *Aspergillus* and their application in chemosystematics. Microbiology (Mikrobiologiya). 2017;86(2):176-82. DOI: 10.7868/S0026365617020112 (In Russian).

6. Serafim L, Lemos O, Levantesi C, Tandoi V, Santos H, Reis MA. Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms. J Microbiol Meth. 2002;51(1):1-18.
7. Pavlov E, Aschar-Sobbi R, Campanella M, Turner RJ, Gómez-García MR, Abramov AY. Inorganic polyphosphate and energy metabolism in mammalian cells. J Biol Chem. 2010 Mar 26;285(13):9420-8. DOI: 10.1074/jbc.M109.013011
8. Ryazanova L, Andreeva N, Kulakovskaya T, Valiakhmetov A, Yashin V, Vagabov V, Kulaev I. The early stage of polyphosphate accumulation in Saccharomyces cerevisiae: comparative study by extraction and DAPI staining. Adv Biosci Biotechnol. 2011;2(04):293-7.
9. Martin P, Van Mooy BA. Fluorometric quantification of polyphosphate in environmental plankton samples: extraction protocols, matrix effects, and nucleic acid interference. Appl Environ Microbiol. 2013 Jan;79(1):273-81. DOI: 10.1128/AEM.02592-12
10. Young Y, Cerniglia C. (eds.). Microbiological Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals, In L. Y. Young and C. E. Cerniglia (eds.), Microbiological Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals, Wiley-Liss, New York. (1995) pp. 301-324.

Информация о соавторах:

Антипова Татьяна Валентиновна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории вторичных метаболитов ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов» РАН
Адрес: 142290, Московская область, Серпуховский р-н, г. Пущино, пр-т Науки, 5
Телефон: (4967) 31-8596
E-mail: tatantip@rambler.ru

Филатова Ирина Юрьевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов» РАН
Адрес: 142290, Московская область, Серпуховский р-н, г. Пущино, пр-т Науки, 5
Телефон: (4967) 31-8661
E-mail: irafilatova24@gmail.com

Звонарёв Антон Николаевич, младший научный сотрудник лаборатории ВНТК трехмерных структур микроорганизмов ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов» РАН
Адрес: 142290, Московская область, Серпуховский р-н, г. Пущино, пр-кт Науки, 5
Телефон: (4967) 31-8516
E-mail: zvonarev@ibpm.pushchino.ru

Кулаковская Татьяна Валентиновна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией регуляции биохимических процессов ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов» РАН
Адрес: 142290, Московская область, Серпуховский р-н, г. Пущино, пр-кт Науки, 5
Телефон: (4967) 31-8578
E-mail: alla@ibpm.pushchino.ru

Вайнштейн Михаил Борисович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией физиологии микроорганизмов ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов» РАН
Адрес: 142290, Московская область, Серпуховский р-н, г. Пущино, пр-кт Науки, 5
Телефон: (4967) 73-2677
E-mail: vain@ibpm.pushchino.ru

Information about co-authors:

Tatyana V. Antipova, PhD (Biology) laboratory secondary metabolites, Skryabin Institute of biochemistry and physiology of microorganisms RAS
Address: 5 Nauki Ave., Pushchino, Serpukhov district, Moscow region, 142290, Russian Federation
Phone: (4967) 31-8596
E-mail: tatantip@rambler.ru

Irina Yu. Filatova, junior researcher of Molecular microbiology laboratory, Skryabin Institute of biochemistry and physiology of microorganisms RAS
Address: 5 Nauki Ave., Pushchino, Serpukhov district, Moscow region, 142290, Russian Federation
Phone: (4967) 31-8661
E-mail: irafilatova24@gmail.com

Anton N. Zvonarev, junior researcher of VNTK three-dimensional structures of microorganisms Skryabin Institute of biochemistry and physiology of microorganisms RAS
Address: 5 Nauki Ave., Pushchino, Serpukhov district, Moscow region, 142290, Russian Federation
Phone: (4967) 31-8516.
E-mail: zvonarev@ibpm.pushchino.ru.

Tatyana V. Kulakovskaya, Doctor of Biological Sciences, head laboratory regulation of biochemical processes, Skryabin Institute of biochemistry and physiology of microorganisms RAS
Address: 5 Nauki Ave., Pushchino, Serpukhov district, Moscow region, 142290, Russian Federation
Phone: (4967) 31-8578
E-mail: alla@ibpm.pushchino.ru

Mikhail B. Vaintstein, Doctor of Biological Sciences, head of laboratory physiology of microorganisms Skryabin Institute of biochemistry and physiology of microorganisms RAS
Address: 5 Nauki Ave., Pushchino, Serpukhov district, Moscow region, 142290, Russian Federation
Phone: (4967) 73-2677
E-mail: vain@ibpm.pushchino.ru

Атака на бактерии с помощью поверхностей, подобных коже акул

Исследователи разработали покрытие, которое наполнено противомикробными средствами и имеет узорчатую алмазоподобную текстуру кожи акулы.

Пациенты в больницах подвержены риску развития инфекций, просто касаясь загрязненных постелей и дверных ручек. Ученые разрабатывают покрытия для этих часто касаемых поверхностей для борьбы с распространением и ростом микробов. Например, Sharklet AF™ – это покрытие, предназначенное для имитации кожи акулы и уменьшающее способность бактерий прилипать к поверхностям. Но долгосрочное использование приведет к накоплению бактерий. Ученые хотели посмотреть, будет ли добавление наночастиц диоксида титана (TiO_2), которые являются антибактериальными, к материалу кожи акулы, эффективно бороться с микробами.

Были напечатаны искусственные поверхности кожи акулы с полимерными и керамическими композитами, с добавкой к ним наночастиц диоксида титана. Поверхность кожи акулы без наночастиц уменьшала прикрепление *E. coli* на 70% по сравнению с гладкими пленками. Но поверхности кожи акулы с наночастицами TiO_2, подвергшимися воздействию ультрафиолетового излучения, за один час погибают более чем на 95% бактерий *E. coli* и 80% клеток золотистого стафилококка. Эту технологию предполагают передать в массовое производство.

Dundar Arisoy F, Kolewe KW, Homyak B, Kurtz IS, Schiffman JD, Watkins JJ
Bioinspired Photocatalytic Shark-Skin Surfaces with Antibacterial and Antifouling Activity via Nanoimprint Lithography.
ACS Appl Mater Interfaces. 2018;10(23):20055-20063. doi: 10.1021/acsami.8b05066.

Бактериология, 2018, том 3, №1, с. 22–25
Bacteriology, 2018, volume 3, No 1, p. 22–25

DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-22-25

Идентификация и диагностика возбудителей микоплазменных маститов коров при помощи бактериологических и молекулярно-генетических методов

Э.Д.Шнейдер, С.А.Макавчик

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Цель исследования. Применение бактериологических и молекулярно-генетических методов для исследования маститного молока коров на наличие микоплазменных возбудителей.
Материалы и методы. Были отобраны пробы маститного молока для выявления возбудителей рода *Mycoplasma* и идентификации их до вида. Для транспортировки, выделения и первичной дифференциации микоплазм по биохимическим свойствам использовалась готовая питательная среда «Mycoplasma-50». В ходе работы для диагностики и идентификации возбудителя были применены два вида полимеразной цепной реакции (ПЦР): ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации и ПЦР в микрочиповом формате с лиофилизированными тест-системами.
Результаты. Испытуемые пробы не дали положительного результата на среде «Mycoplasma-50». Результаты электрофоретической детекции в режиме реального времени показывают наличие генетического материала бактерий *Mycoplasma spp.* График регистрации результатов ПЦР в микрочиповом формате с лиофилизированными тест-системами говорит об обнаружении генетического материала *Mycoplasma bovis* в исследуемых пробах маститного молока.
Выводы. Использование культурального и молекулярно-генетического метода (ПЦР) позволяет выделить и идентифицировать *Mycoplasma spp*., благодаря чему возможно своевременное выявление болезни и назначение оптимального лечения.
Ключевые слова: бактериология, «Микоплазма-50», культивирование, полимеразная цепная реакция, Mycoplasma bovis, Mycoplasma spp., видовая идентификация, микрочиповый формат

Для цитирования: Шнейдер Э.Д., Макавчик С.А. Идентификация и диагностика возбудителей микоплазменных маститов коров при помощи бактериологических и молекулярно-генетических методов. Бактериология. 2018; 3(1): 22–25. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-22-25

Identification and diagnostics of pathogens of bovine mycoplasma mastitis by bacteriological and molecular genetic methods

E.D.Shneyder, S.A.Makavchik

St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Purpose. The usage of bacteriological and molecular methods for the investigation of mastic milk for the presence of mycoplasma exciters.
Materials and methods. The probes of mastic milk were chosen to detect the exciters of *Mycoplasma* genus and to identify them as species. There were used such the before prepared nutritiou environment as "Mycoplasma-50" for transportation and for liberation and for primary differentiation of mycoplasmas due to biochemical internals. During the research were used two kinds of polymerase chain reactions (PCR) for diagnostics and identification of exciters: PCR with electrophoretic detection of products of amplification with the use of test systems and PCR in microchip form with lyophilized test systems.
Results. The testes probes didn't give Any positive results in prepared environment "Mycoplasma-50". The results of electrophoresis detection in real time mode show the presence of genetic material of *Mycoplasma spp.* bacteria. The schedule of PCR results in microchip form with lyophilized test systems registration informs about the detection of genetic materials of *Mycoplasma bovis* in researched probes of mastic milk.
Conclusion. The usage of cultural of molecular-biological methods (PCR) lets exactly distinguish *Mycoplasma* hominis bovis that helps to discover the disease in good time and make the optimal treatment.
Keywords: bacteriology, «Mycoplasma-50», cultivation, polymerase chain reaction, the species identification, Mycoplasma bovis, Mycoplasma spp., microchip format, polymerase chain reaction, species identification

For citation: Shneyder E.D., Makavchik S.A. Identification and diagnostics of pathogens of bovine mycoplasma mastitis by bacteriological and molecular genetic methods. Bacteriology. 2018; 3(1): 22–25. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-22-25

Для корреспонденции:

Шнейдер Эвелин Дмитриевна, студентка ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины»

Адрес: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5
Телефон: (812) 387-5144
E-mail: linevelin21@mail.com

Статья поступила 17.01.2018 г., принята к печати 30.03.2018 г.

For correspondence:

Evelin D. Shneyder, student of the St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine

Address: 5 Chernigovskaya str., St. Petersburg, 196084, Russian Federation
Phone: (812) 387-5144
E-mail: linevelin21@mail.com

The article was received 17.01.2018, accepted for publication 30.03.2018

Воспаление вымени коров и телок в зависимости от вида и вирулентности микоплазм протекает чаще бессимптомно, без заметного увеличения клеточных элементов в молоке, или же клинически выражено – отек, уплотнение и болезненность пораженных долей вымени, секрет становится водянистым с примесью небольшого количества хлопьев казеина. Возбудителями микоплазменных маститов являются *Mycoplasma bovigenitalium, Mycoplasma bovimastitidis, Mycoplasma agalactiae, Mycoplasma bovis* [1].

Микоплазмы растут только на многокомпонентных средах, включающих витамины, аминокислоты, углеводы, неорганические соли. Для их дифференциации нужны специальные сложные питательные среды, содержащие аргинин и глюкозу. Приготовление питательных сред для микоплазм в диагностической лаборатории длительно и трудоемко. Использование готовых наборов питательных сред для культивирования микоплазм облегчает и ускоряет процесс выделения и идентификации микоплазм [2].

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является одним из ведущих методов современной лабораторной диагностики в ветеринарной медицине. Метод ПЦР особенно эффективен для диагностики трудно культивируемых форм микроорганизмов при острых и хронических инфекциях [3].

Цель данной работы – исследования маститного молока коров на наличие микоплазменных возбудителей бактериологическими и молекулярно-генетическими методами.

Материалы и методы

В хозяйствах Северо-Западного региона у маститных коров были отобраны пробы молока для выявления возбудителей рода *Mycoplasma* и идентификации их до вида.

Для транспортировки проб, первичного посева и дифференциации микроорганизмов применяли питательную среду «Mycoplasma-50» (НИИЭМ им. Пастера). Для контроля использовали плотную среду для урогенитальных микоплазм – модифицированную среду Хейфлика, содержащую дрожжевой экстракт, сыворотку крови лошади, теллурит калия (лаборатория микробиологии НИИ АГиР им. Д.О. Отта). Среды подготавливали согласно инструкции по применению. Посевы на жидкой среде в пробирках Эппендорфа культивировали в термостате при температуре 37–38°С 72 ч, просматривая ежедневно. Посевы на плотной среде культивировали при тех же режимах в атмосфере избыточного количества CO_2 (в эксикаторе) до 7 сут. Положительным контролем служили пробирки и чашки с посевами на тех же средах культур *M. hominis* (аргининферментирующая микоплазма).

В ходе работы применили два вида ПЦР: ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации с использованием тест-систем (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора), а также ПЦР в микрочиповом формате с лиофилизированными тест-системами (ООО «Люмэкс-маркетинг», Россия).

Для идентификации *Mycoplasma spp.* проводили постановку ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации. Выделение ДНК из отобранных образцов проводили с использованием оптимизированного коммерческого набора «РИБО-преп» («ИнтерЛабСервис», Россия). Для процесса амплификации ПЦР с электрофоретической детекцией использовали прибор «Терцик» (ООО «ДНК Технология», Москва). Для проведения электрофоретической детекции использовали камеру для электрофоретических разделений ПЦР-продуктов в агарозном геле.

Для видовой идентификации использовали ПЦР в реальном времени с набором микрочипов с лиофилизированными тест-системами. Для проведения амплификации применяли микрочиповый ПЦР-РВ амплификатор «АриаДНА» (ООО «Люмекс-маркетинг», Россия).

Результаты и обсуждение

Положительный результат на среде «Mycoplasma hominis-50» – это четкий визуальный переход окраски pH-индикатора от зеленого до фиолетового цвета. Ни одна из испытуемых проб не дала положительного результата – изменения цвета в пробирках не обнаружено. Но через 72 ч после посева на плотной среде для урогенитальных микоплазм при просмотре с увеличением ×40 был отмечен рост характерных для микоплазм мелких колоний неправильной округлой формы, с зернистой поверхностью. Произвели пересев с жидкой питательной среды на плотную среду и через 3 сут увидели рост характерных для микоплазм колоний (рис. 1).

Таким образом, в исследуемых пробах была обнаружена группа «неферментирующих» глюкозу и аргинин микоплазм, к которой относятся *Mycoplasma bovis* и *Mycoplasma bovigenitalium*. При снижении иммунного статуса данные микроорганизмы самостоятельно или вместе с другими микроорганизмами способны вызывать маститы, вульвовагиниты и бесплодие у коров, а также пневмонии и артриты у телят.

Анализ электрофореграмм проводили с помощью фотосистемы (рис. 2).

Полосы электрофореграммы четкие, что свидетельствует о содержании нужных копий ДНК в отобранных образцах. Следовательно, результат можно признать положительным. В качестве «положительного контроля» использовали стандарт ДНК искомого микроорганизма. «Положительный контроль» позволяет удостовериться, что все компоненты, входящие в состав реакционной смеси, обеспечивают нормальное прохождение реакции. Отрицательные контроли (в качестве пробы буферные растворы наборов для растворения выделенных ДНК – соответственно наборам).

Амплификатор «АриаДНА» осуществляет ПЦР-РВ анализ с использованием двухканального флуоресцентного детектора. Чип с иммобилизованными в микрореакторах компонентами ПЦР-смеси позволяет сократить время подготовки к проведению эксперимента, упростить и ускорить процедуру анализа, а также делает возможным скрининг большого числа проб за короткое время (рис. 3).

По окончании ПЦР-анализа происходит автоматическая генерация отчетов с информацией о наличии или отсутствии искомых возбудителей (наличии или отсутствии свечения) посредством построения графика анализа результатов амплификации специфических участков ДНК (рис. 4).

Рис. 1. **Результат учета исследуемых проб на среде «Mycoplasma hominis-50» на четвертые сутки.**

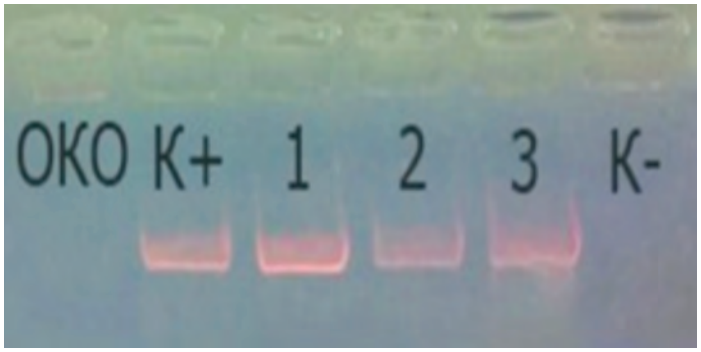


Рис. 2. **Учет результатов детекции продуктов амплификации в агарозном геле.**

Рис. 3. **Микрочиповый ПЦР–РВ амплификатор «АриаДНА», ООО «Люмекс-маркетинг».**

Используемая в медицине готовая жидкая питательная среда «Mycoplasma-50», предназначенная для выделения, идентификации аргининферментирующих и глюкозоферментирующих микоплазм человека, может использоваться для выделения, первичной дифференциации урогенитальных микоплазм крупного рогатого скота, с параллельным использованием плотной модифицированной среды Хейфлика в качестве контроля. *Mycoplasma bovis* и *Mycoplasma bovigenitalium* росли на данных средах, но не изменяли цвет индикатора, что затрудняло оценку теста. Но, учитывая трудности изготовления сложных специальных питательных сред, применение питательных сред «Mycoplasma bovis» в ветеринарной микробиологии является целесообразным.

Результаты электрофоретической детекции в режиме реального времени показывают наличие генетического материала бактерий *Mycoplasma spp*. Результаты ПЦР в микрочиповом формате с лиофилизированными тест-системами свидетельствуют об обнаружении генетического материала *Mycoplasma bovis*.

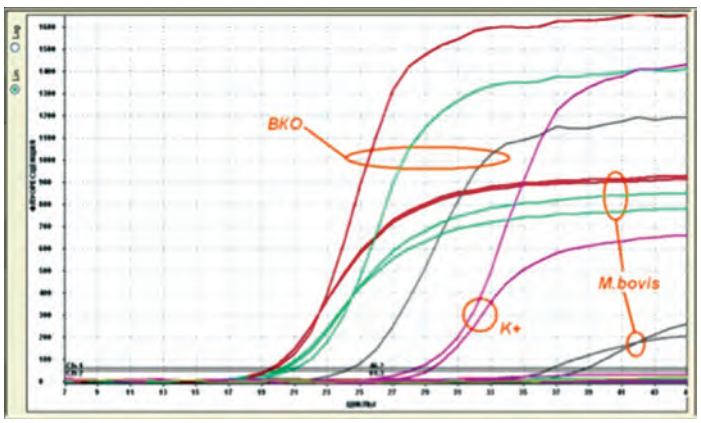


Рис. 4. **График регистрации результатов ПЦР в режиме реального времени с использованием лиофилизированных тест–систем на микрочипе:** ВКО – внутренний контрольный образец; К+ – положительный контроль; *M. bovis* – ДНК в пробах маститного молока.

Заключение

Использование готовой питательной среды «Mycoplasma-50» производства «Отдела новых технологий НИИЭМ им. Пастера» для обнаружения и идентификации микоплазм в образцах от крупного рогатого скота является более простым и удобным способом, так как приготовление специальных питательных сред для микоплазм в диагностической лаборатории – более трудоемкий и длительный процесс.

В ветеринарной лабораторной практике все большее применение находят различные виды ПЦР с целью быстрой идентификации возбудителей, культивирование которых слишком длительно и трудоемко или затруднено.

Литература

1. Раковская ИВ, Горина ЛГ, Зигангирова НА, Гончарова СА, Гамова НА. Механизмы персистенции урогенитальных микоплазм и методы их выявления. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2000;4: 47-52.
2. Митрофанов ПМ. Патоморфология и патогенез микоплазменных инфекций крупного рогатого скота вызванных *M. bovirhinis* и *M. bovigenitalium*. Научно технический бюллетень. 1981;33:16-22.
3. Смирнова ЛИ, Макавчик СА, Белкина ИВ, Приходько ЕИ. Применение культурального метода и полимеразной цепной реакции (ПЦР) для выделения и идентификации *Micoplasma synoviae* птиц. Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2015;4:61-4.

References

1. Rakovskaya IV, Gorina LG, Zigangirova NA, Goncharova SA, Gamova NA. Mekhanizmy persistentsii urogenital'nykh mikoplazm i metody ikh vyyavleniya. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2000;4:47-52. (In Russian).
2. Mitrofanov PM. Patomorfologiya i patogenez mikoplazmennykh infektsii krupnogo rogatogo skota vyzvannykh *M. bovirhinis* i *M. bovigenitalium*. Nauchno tekhnicheskii byulleten'. 1981;33:16-22. (In Russian).
3. Smirnova LI, Makavchik SA, Blokhin IV, Prikhodko EI. Application of cultural method and polymerase chain reaction (PCR) for isolation and identification of *Mycoplasma synoviae* poultry. Issues of Legal Regulation in Veterinary Medicine. 2015;4:61-4. (In Russian).

Информация о соавторе:

Макавчик Светлана Анатольевна, кандидат ветеринарных наук, доцент ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины»
Адрес: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5
Телефон: (812) 387-5144
E-mail: groza81@mail.ru

Information about co-authors:

Svetlana A. Makavchik, candidate of veterinary sciences, associate professor of the St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine
Address: 5 Chernigovskaya str., St. Petersburg, 196084, Russian Federation
Phone: (812) 387-5144
E-mail: groza81@mail.ru

Новый метод может быстро и точно выявлять инфекции

В новом исследовании описывается метод, который может быстро и точно показать, заражен ли человек вредными бактериями или другими патогенами. Кроме того, этот новый метод показывает точную степень тяжести инфекции у человека.

Наиболее распространенным методом тестирования на инфекцию в медицинских учреждениях в настоящее время являются полоски, приобретающие определенный цвет при контакте с зараженными жидкостями. Недостоверности анализа, полученного этим методом, возникают из-за субъективной оценки цвета и в случае цветных жидкостей (моча, кровь).

Микробиологические методы или исследование образцов жидкости организма под микроскопом и подсчет лейкоцитов, которые являются показателем инфекции, являются более медленными процессами и требуют более высококвалифицированного персонала.

Авторы исследования решили проверить электрохимический подход и создали молекулы, которые связываются с ферментами лейкоцитов и производят электрический ток, сигнализируя о наличии инфекции. Молекулы размещены на тест-полоске. После контакта с инфицированными жидкостями полоска подключается к компьютерному монитору, который отображает четкий диапазон электрохимических ответов, демонстрирующих тяжесть инфекции.

Метод может быть особенно полезен для пациентов, которые только что подверглись хирургическому вмешательству, поскольку он может окончательно определить, есть ли у них инфекция от процедуры до того, как она ухудшится.

Подана заявка на патент на изобретение, опубликованы два документа и планируются дальнейшие работы по оптимизации метода.

Hanson D, Menard T, Blazek T, McHardy S, Gorski W.
Synthesis and Characterization of Pyridine Compounds for Amperometric Measurements of Leukocyte Esterase.
Chembiochem. 2018 Apr 20. doi: 10.1002/cbic.201800164.

Использование бактерий для сокращения молочных отходов

Процесс изготовления молочных продуктов создает много отходов в виде кислой сыворотки, но команда ученых из Университета Корнелла, США и Тюбингенского университета в Германии открыла способ превратить эти отходы в полезные соединения с использованием бактерий. Кислотная сыворотка в основном состоит из сахаров и кислоты, но она слишком кислая, чтобы ею можно было кормить скот. Исследователи обнаружили, что в реакторных емкостях, заполненных бактериями, обнаруженными в кишечных микробных сообществах, кислотная сыворотка может быть превращена в более полезные вещества, такие как капроновая и каприловая кислота, которые являются естественными противомикробными средствами и могут использоваться в кормах для скота. В качестве альтернативы дальнейшая обработка может превратить производственные отходы в соединения, которые могут быть дополнительно очищены до биотоплива.

Xu J, Hao J, Guzman JJL, Spirito CM, Harroff LA, Angenent LT.
Temperature-Phased Conversion of Acid Whey Waste Into Medium-Chain Carboxylic Acids via Lactic Acid: No External e-Donor.
Joule 2, 280–295. https://doi.org/10.1016/j.joule.2017.11.008

Бактериология, 2018, том 3, №1, с. 26–32
Bacteriology, 2018, volume 3, No 1, p. 26–32

DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-26-32

Создание базы данных клинических штаммов грамотрицательных бактерий для изучения молекулярных механизмов антибиотикорезистентности

П.В.Слукин, А.И.Лев, Е.И.Асташкин, Э.А.Светоч, Н.К.Фурсова

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

Создана и зарегистрирована в Реестре база данных «Клинические штаммы грамотрицательных бактерий для изучения молекулярных механизмов антибиотикорезистентности» (Свидетельство о регистрации № 2017621413 от 01.12.2017 г.), которая содержит информацию о 878 штаммах семейства *Enterobacteriaceae* и неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных в лечебных учреждениях г. Москвы в 2004–2016 гг. База данных включает в себя 17 таблиц (4 основных, 2 обобщающих, 9 справочных и 2 дополнительных), 22 запроса для анализа спектра чувствительности штаммов к антибактериальным препаратам и 7 форм для введения информации. База данных предназначена для использования при расследовании вспышек и спорадических случаев инфекций, для оценки эпидемиологических и генетических особенностей их возбудителей, для характеристики штаммов грамотрицательных бактерий при депонировании.

Ключевые слова: база данных, антибиотикорезистентность, грамотрицательные бактерии, фенотип, генотип

Для цитирования: Слукин П.В., Лев А.И., Асташкин Е.И., Светоч Э.А., Фурсова Н.К. Создание базы данных клинических штаммов грамотрицательных бактерий для изучения молекулярных механизмов антибиотикорезистентности. Бактериология. 2018; 3(1): 26–32. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-26-32

The gram-negative bacterial clinical strains database for studying of antibacterial resistance molecular mechanisms

P.V.Slukin, A.I.Lev, E.I.Astashkin, E.A.Svetoch, N.K.Fursova

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnologyof the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Obolensk, Russian Federation

The database «Gram-negative Bacterial Clinical Strains for the Study of Antibiotic Resistance Molecular Mechanisms» has been created and registered in the State Register (Registration Certificate No. 2017621413 of 01.12.2017). The database contains information about 878 strains of the *Enterobacteriaceae* family and nonfermentative Gram-negative bacteria isolated in Moscow medical care units in 2004–2016. The database includes 17 tables (4 basic, 2 generalizing, 9 reference and 2 additional), 22 requests (for analyzing the sensitivity spectrum of strains to antibacterial drugs) and 7 forms (for introducing information). The database was designed for using in investigating outbreaks and sporadic cases of infections, for assessing the epidemiological and genetic characteristics of their agents, for characterizing strains of Gram-negative bacteria for deposition.

Keywords: database, antibiotic resistance, gram-negative bacteria, phenotype, genotype

For citation: Slukin P.V., Lev A.I., Astashkin E.I., Svetoch E.A., Fursova N.K. The gram-negative bacterial clinical strains database for studying of antibacterial resistance molecular mechanisms. Bacteriology. 2018; 3(1): 26–32. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-26-32

Для корреспонденции:

Слукин Павел Владимирович, 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) 36-0079
E-mail: slukin@obolensk.org

Статья поступила 15.01.2018 г., принята к печати 30.03.2018 г.

For correspondence:

Pavel V. Slukin, researcher of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology departments, 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) 36-00-79
E-mail: slukin@obolensk.org

The article was received 15.01.2018, accepted for publication 30.03.2018

Проблема антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов актуальна для здравоохранения во всем мире [1]. Резистентность к антибиотикам у бактерий возникает в результате мутаций или горизонтального переноса генов [2]. В научной литературе описано большое количество молекулярно-генетических механизмов антибиотикорезистентности, основанных на модификации мишеней антибиотиков, инактивации молекул лекарства, изменении проницаемости бактериальных мембран, активации эффлюксных насосов и метаболических шунтов [3]. В результате эволюции антибиотикорезистентности появились бактериальные патогены со множественной лекарственной устойчивостью (MDR), экстремальной лекарственной устойчивостью (XDR) и полной лекарственной устойчивостью (PDR) [4].

В последние годы определен спектр наиболее опасных клинических антибиотикорезистентных бактерий (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp.*), названный аббревиатурой «ESCAPE патогены» – организмы, «избегающие» антимикробного подавления антибиотиками и представляющие собой новую парадигму в патогенезе, трансмиссии и резистентности [5]. Совокупные данные об уровне антибиотикорезистентности, ее молекулярных механизмах и предполагаемых молекулярных механизмах распространения, наряду с генетической характеристикой штамма, такой как сиквенс-тип и генотип вирулентности, являются очень важной эпидемиологической информацией, поскольку позволяют определить происхождение штаммов, источник и пути распространения инфекции, методики лечения и предупреждения развития заболеваний [6].

В связи с этим постоянно развиваются методы диагностики антибиотикорезистентности и ее механизмов, что приводит к необходимости разработки пополняемых баз данных для анализа вновь поступающей информации.

База данных (БД) – это интегрированная компьютерная структура, содержащая совокупность систематизированных данных и метаданных, предоставляющая конечному пользователю возможность поиска и обработки информации, содержащейся в ней [7]. В Российской Федерации на сегодняшний день осуществляется государственная регистрация БД в качестве результатов интеллектуальной деятельности (РИД). В качестве примера можно привести БД по антибиотикорезистентности возбудителей инфекций, передающихся половым путем (ИППП) [8], а также БД по характеристикам нуклеотидных последовательностей геномов штаммов возбудителей бактериальных и вирусных инфекций I–II групп патогенности [9].

Цель настоящей работы – создание пополняемой БД, позволяющей осуществить поиск и обработку информации об источниках и времени выделения клинических штаммов грамотрицательных бактерий, их фенотипах и генотипах антибиотикорезистентности, наличии у них генов вирулентности, а также систематизировать имеющиеся данные по сиквенс-типам. БД предназначена для специалистов микробиологических лабораторий, расследующих вспышки и спорадические случаи госпитальных и внегоспитальных инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями; при оценке эпидемиологических и генетических особенностей возбудителей, выделяемых из клинического материала, от животных и из окружающей среды; для специалистов, занимающихся коллекционной работой, – для описания новых генотипов штаммов и депонирования в Государственные коллекции патогенных микроорганизмов.

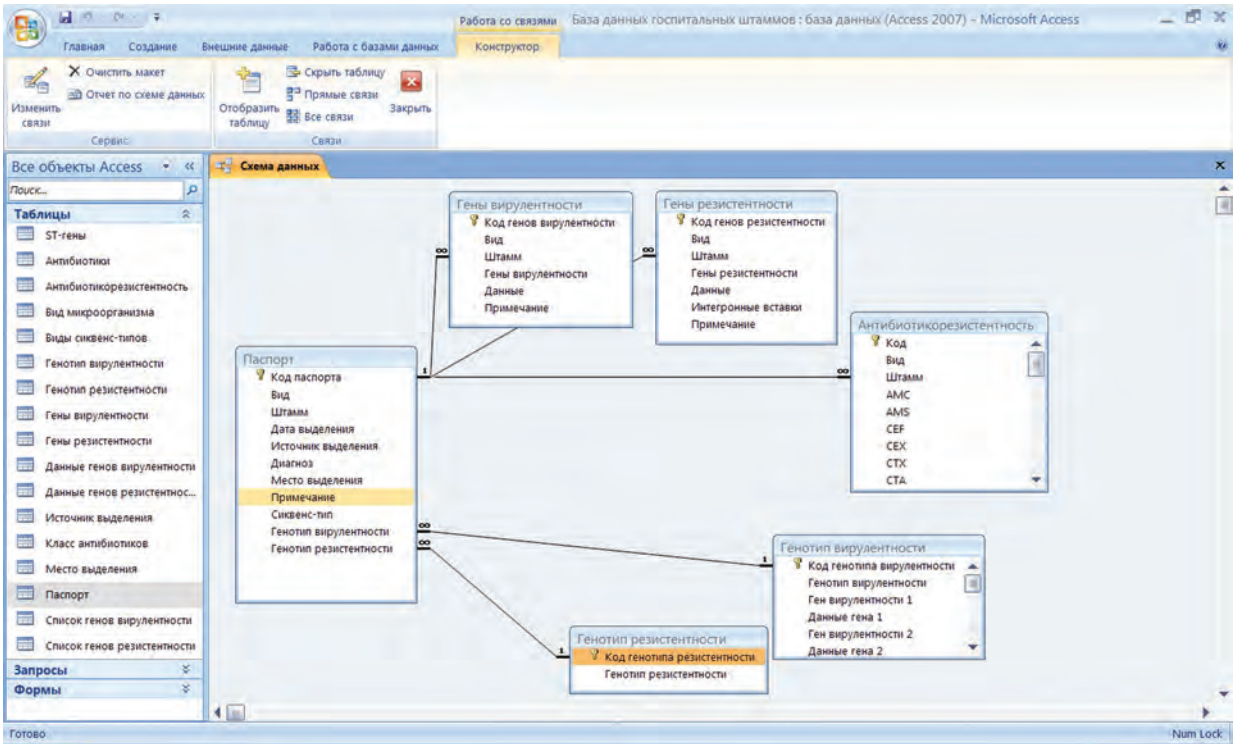


Рис. 1. **Схема данных основных таблиц «Паспорт», «Гены вирулентности», «Гены резистентности», «Антибиотикорезистентность» и обобщающих таблиц «Генотип резистентности», «Генотип вирулентности».**

Материалы и методы

Для создания БД «Клинические штаммы грамотрицательных бактерий для изучения молекулярных механизмов антибиотикорезистентности» использовали программу Microsoft Office Access 2007 со стандартным пакетом приложений. Структура БД включает в себя таблицы, предназначенные для хранения информации, а также стандартные методы обработки информации.

Для заполнения таблиц БД использовали информацию о клинических штаммах грамотрицательных бактерий III–IV групп патогенности, полученных в ходе мониторинговой работы и расследований вспышек инфекционных заболеваний в лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (ФБУН ГНЦ ПМБ) в 2004–2016 гг. [10, 11]. Для каждого штамма вносили информацию по следующим категориям: клинико-эпидемиологические данные (дата выделения, источник выделения, место выделения, диагноз); фенотип антибиотикорезистентности (минимальные подавляющие концентрации (МПК) антибактериальных препаратов, интерпретация чувствительности); гены антибиотикорезистент-

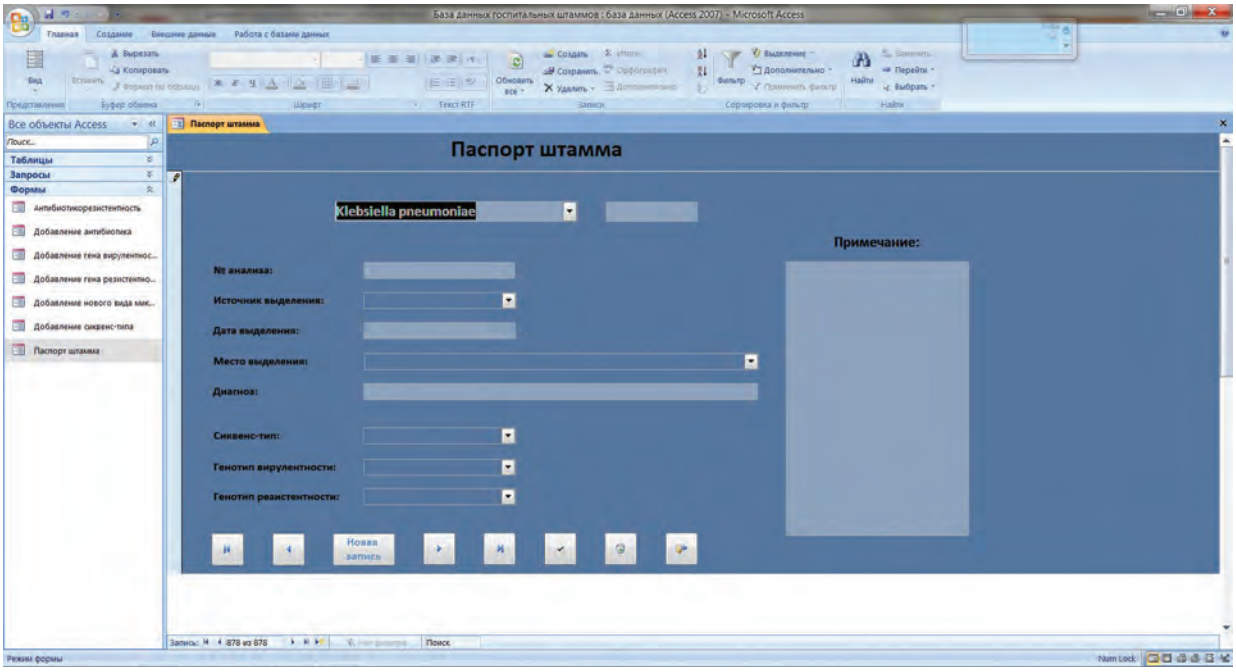


Рис. 2. **Форма «Паспорт штамма».**

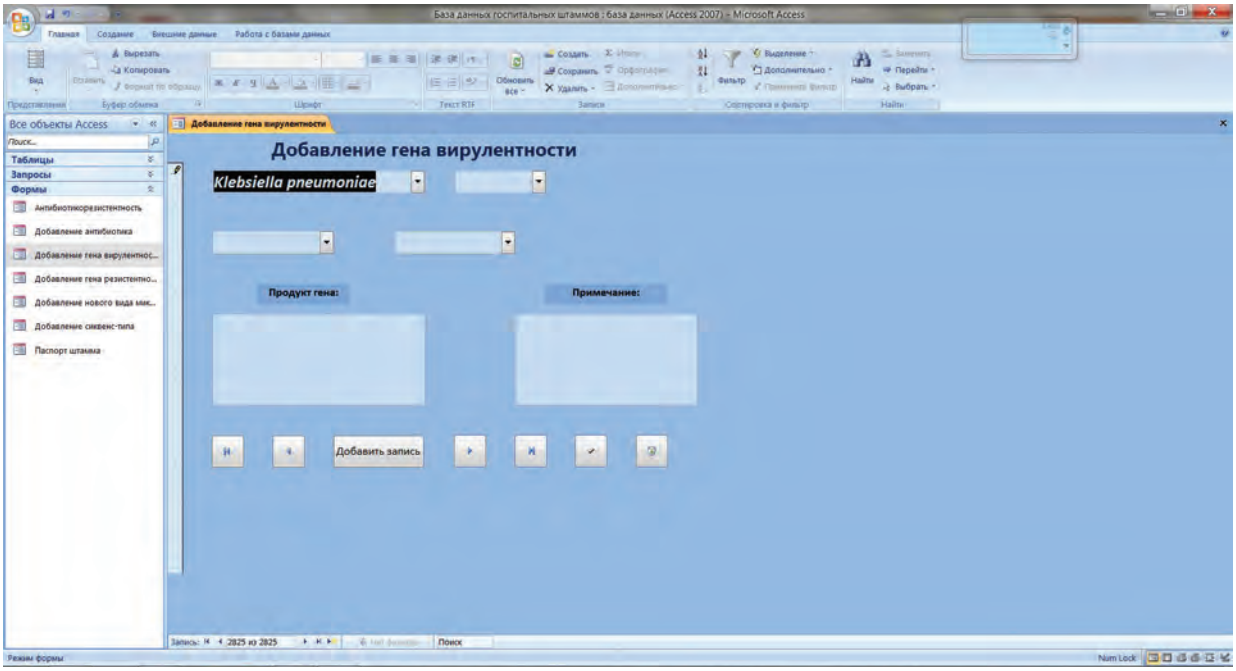


Рис. 3. **Форма «Добавление гена вирулентности».**

ности; для ряда штаммов описаны гены вирулентности и сиквенс-типы. В соответствии с этическими требованиями БД не содержит персональной информации пациентов (имени и фамилии, возраста, этнической и расовой принадлежности и др.).

Результаты и обсуждение

БД «Клинические штаммы грамотрицательных бактерий для изучения молекулярных механизмов антибиотикорезистентности» содержит информацию о 878 штаммах семейства *Enterobacteriaceae* и неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ), принадлежащих к 23 видам. Клинические штаммы были выделены в лечебных учреждениях города Москвы в период с 2004 по 2016 гг. БД включает в себя 17 таблиц, 22 запроса и 7 форм. Объем программы оптимизирован для удобства работы на флеш-носителях и составляет 9,4 Мбайта. База данных включает четыре основные таблицы, которые содержат уникальную информацию, а также две обобщающие таблицы, девять справочных таблиц и две дополнительные таблицы (рис. 1).

Таблица «Паспорт» содержит основную эпидемиологическую информацию о каждом штамме, а также обобщенную характеристику каждого штамма, генерируемую на

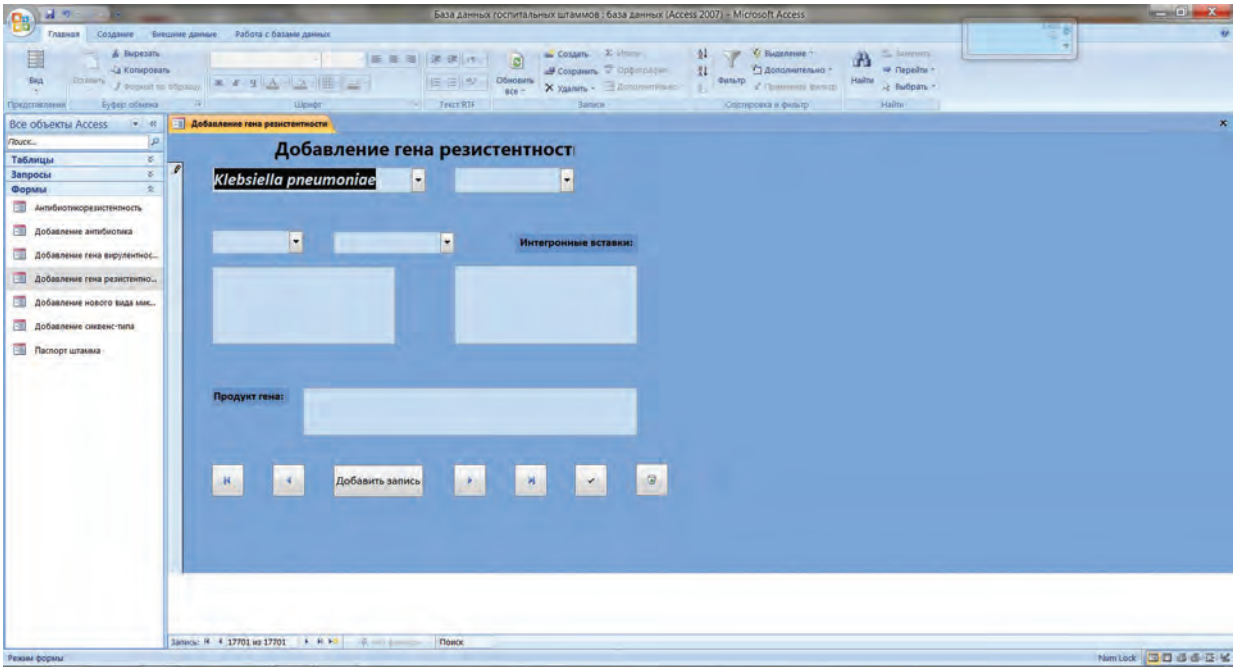


Рис. 4. **Форма «Добавление гена резистентности».**

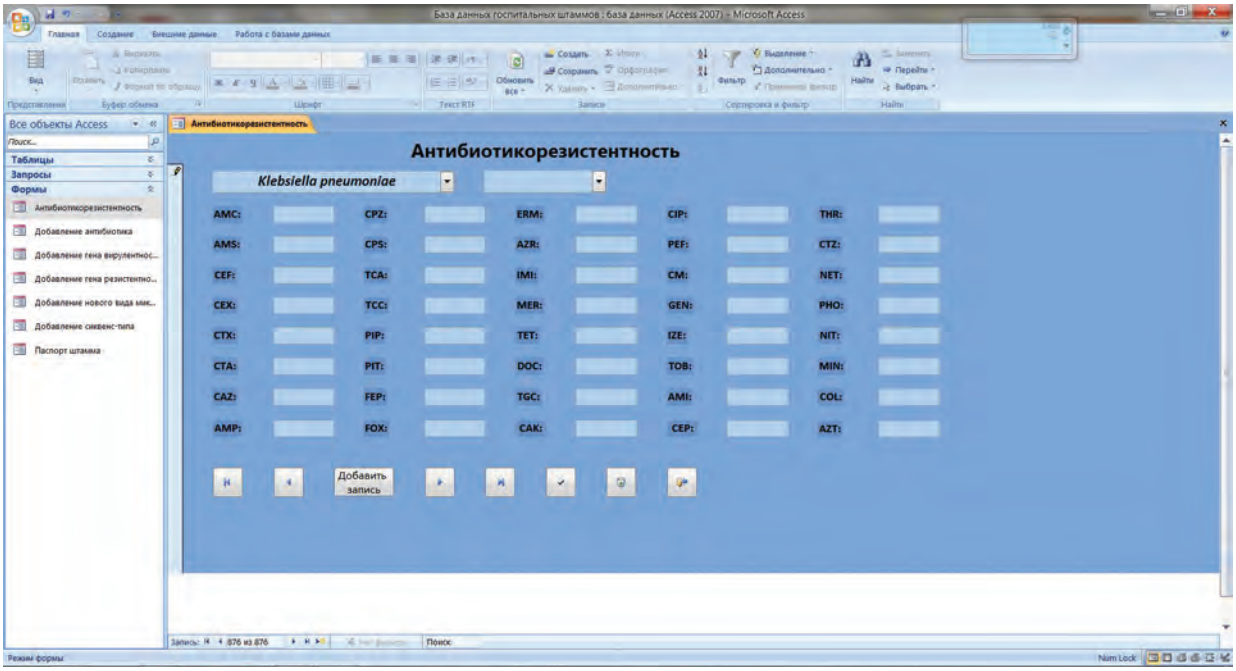


Рис. 5. **Форма «Антибиотикорезистентность».**

основе других таблиц («Генотип резистентности», «Генотип вирулентности»). Для заполнения таблицы «Паспорт» создана форма «Паспорт штамма», позволяющая вносить данные о виде микроорганизма, названии штамма, дате, источнике и месте выделения, а также о диагнозе заболевания (рис. 2).

Основная таблица «Гены вирулентности» содержит информацию о наличии генов вирулентности у бактерий данного штамма, для заполнения которой создана форма «Добавление гена вирулентности», позволяющая вносить для конкретных штаммов наименования и характеристики генов вирулентности (рис. 3).

Основная таблица «Гены резистентности» содержит информацию о наличии генов антибиотикорезистентности в штаммах бактерий. Для заполнения этой таблицы создана форма «Добавление гена резистентности», позволяющая вносить для конкретных штаммов наименования и характеристики генов антибиотикорезистентности (рис. 4).

В основной таблице «Антибиотикорезистентность» содержится информация о чувствительности штаммов к 40 антибактериальным препаратам. Для заполнения этой таблицы разработана форма «Антибиотикорезистентность», с помощью которой можно вносить значения МПК всех антибиотиков для каждого штамма (рис. 5).

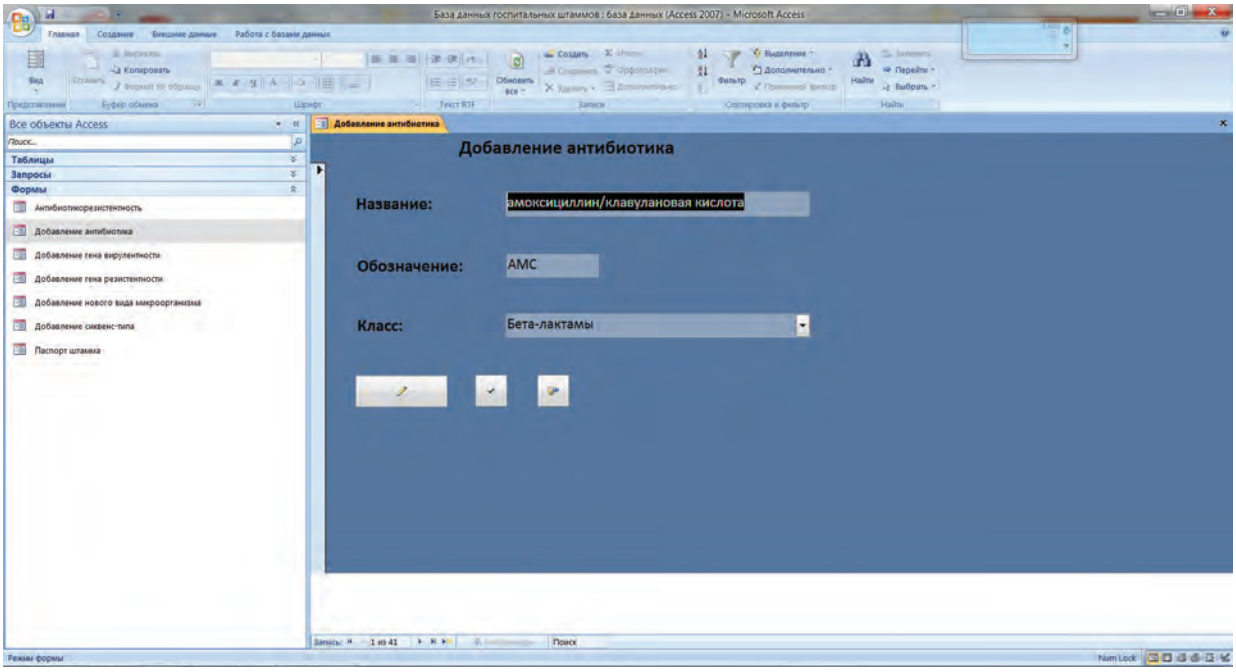


Рис. 6. **Форма «Добавление антибиотика».**

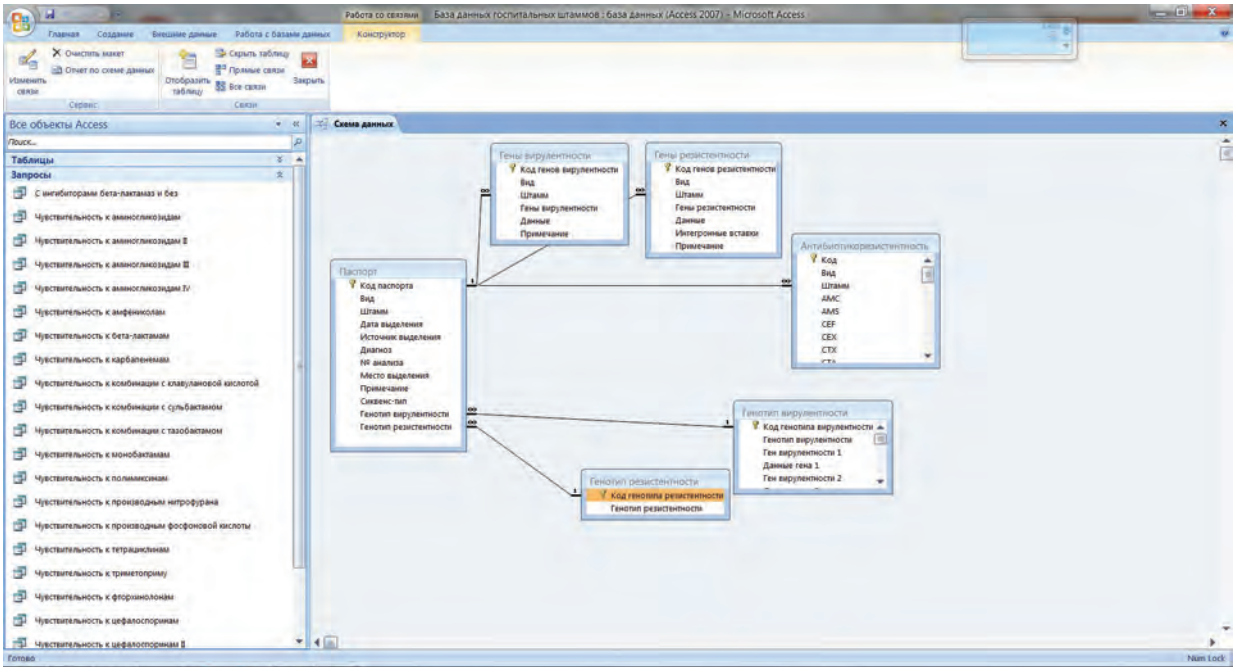


Рис. 7. **Запросы базы данных по спектру чувствительности штаммов к отдельным функциональным группам антибиотиков.**

Обобщающие таблицы «Генотип вирулентности» и «Генотип резистентности» позволяют консолидировать данные таблиц «Гены вирулентности» и «Гены резистентности» соответственно и получить на выходе характеристики генотипов вирулентности и антибиотикорезистентности, которые адресуются в таблицу «Паспорт».

Перечень значений ячеек, используемых в основных таблицах, содержится в девяти справочных таблицах: видовая принадлежность бактерии – в таблице «Вид микроорганизма», название города – в таблице «Место выделения», перечень клинических материалов – в таблице «Источник выделения», наименования функциональных групп антибиотиков – в таблице «Класс антибиотиков», названия антибактериальных препаратов – в таблице «Антибиотики», наименования генов вирулентности – в таблице «Список генов вирулентности», названия генов антибиотикорезистентности – в таблице «Список генов резистентности», наименования генов «домашнего хозяйства», используемых для определения сиквенс-типов – в таблице «ST-гены», номера сиквенс-типов – в таблице «Виды сиквенс-типов». Для заполнения таблиц «Антибиотики», «Вид микроорганизма» и «Виды сиквенс-типов» созданы формы «Добавление антибиотика», «Добавление нового вида микроорганизма» и «Добавление сиквенс-типа» соответственно (рис. 6).

Все формы, используемые для введения информации в БД, снабжены интерактивными кнопками и выпадающими списками, а также защищены стандартными для программы Microsoft Office Access 2007 макросами от случайного введения данных.

База данных позволяет проводить анализ спектра чувствительности штаммов к отдельным функциональным группам антибиотиков с помощью 22 стандартных запросов (рис. 7).

Таким образом, разработанная БД «Клинические штаммы грамотрицательных бактерий для изучения молекулярных механизмов антибиотикорезистентности» позволяет осуществить поиск и обработку информации о клинических штаммах, в том числе об их клинико-эпидемиологических характеристиках, фенотипах и генотипах антибиотикорезистивности и вирулентности, содержании генов антибиотикорезистивности и вирулентности, а также по принадлежности к генетическим линиям (сиквенс-типам).

БД зарегистрирована в Реестре баз данных 1 декабря 2017 г. под № 2017621413.

Финансирование работ

Данная работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Литература

1. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. ISBN 978 92 4. Available from: http://bit.ly/1rOb3cx
2. Andersson DI, Hughes D. Selection and Transmission of Antibiotic-Resistant Bacteria. Microbiol Spectr. 2017;5(4). DOI: 10.1128/microbiolspec.MTBP-0013-2016
3. Wright GD. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Chem Commun (Camb). 2011;47(14):4055-61. DOI: 10.1039/c0cc05111j
4. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012;18(3):268-81. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x. Epub 2011 Jul 27
5. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013;11(3):297-308. DOI: 10.1586/eri.13.12
6. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M β-lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. J Antimicrob Chemother. 2017;72(8):2145-2155. DOI: 10.1093/jac/dkx146
7. Coronel C, Morris SA, Rob P. Database Systems: Design, Implementation, and Management. 12th ed. Cengage Learning, 2017. 818 p. in color. ISBN: 978-1-305-62748-2
8. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2014617611 от 29 июля 2014 г. «Программа для анализа и визуализации данных по лекарственной устойчивости и молекулярному типированию возбудителей ИППП». Доступно на: https://istina.msu.ru/certificates/ 8740969/
9. Яшечкин ЮИ, Найденова ЕВ, Бугоркова ТВ, Щербакова СА. Создание базы данных по характеристикам нуклеотидных последовательностей геномов штаммов возбудителей бактериальных и вирусных инфекций I–II групп патогенности. Проблемы особо опасных инфекций. 2013;1:70-73.
10. Прямчук СД, Фурсова НК, Абаев ИВ, Ковалев ЮН, Шишкова НА, Печерских ЭИ, и др. Генетические детерминанты устойчивости к антибактериальным средствам в нозокомиальных штаммах *Escherichia coli, Klebsiella spp.* и *Enterobacter spp.*, выделенных в России в 2003-2007 гг. Антибиотики и химиотерапия. 2010;55(9-10):3-10
11. Fursova NK, Astashkin EI, Knyazeva AI, Kartsev NN, Leonova ES, Ershova ON, et al. The spread of bla_{OXA-48} and $bla_{OXA-244}$ carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis* and *Enterobacter spp.* isolated in Moscow, Russia. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2015;14:46. DOI: 10.1186/s12941-015-0108-y

References

1. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. ISBN 978 92 4. Available from: http://bit.ly/1rOb3cx
2. Andersson DI, Hughes D. Selection and Transmission of Antibiotic-Resistant Bacteria. Microbiol Spectr. 2017;5(4). DOI: 10.1128/microbiolspec.MTBP-0013-2016
3. Wright GD. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Chem Commun (Camb). 2011;47(14):4055-61. DOI: 10.1039/c0cc05111j
4. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012;18(3):268-81. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x. Epub 2011 Jul 27
5. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013;11(3):297-308. DOI: 10.1586/eri.13.12
6. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M β-lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. J Antimicrob Chemother. 2017;72(8):2145-2155. DOI: 10.1093/jac/dkx146
7. Coronel C, Morris SA, Rob P. Database Systems: Design, Implementation, and Management. 12th ed. Cengage Learning, 2017. 818 p. in color. ISBN: 978-1-305-62748-2
8. Certificate of state registration of the computer program No. 2014617611 of July 29, 2014 "Program for the analysis and visualization of data on drug resistance and molecular typing of STI agents". Available from: https://istina.msu.ru/certificates/8740969/ (In Russian).
9. Yashechkin YuI, Naydenova EV, Bugorkova TV, Shcherbakova SA. Setting-up of the Database on the Nucleotide Sequences of the Genomes of the Strains of Bacterial and Viral Infections Agents of the I–II Pathogenicity Groups. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2013;1:70-73. (In Russian).

10. Priamchuk SD, Fursova NK, Abaev IV, Kovalev IuN, Shishkova NA, Pecherskikh EI. Genetic Determinants of Antibacterial Resistance Among Nosocomial *Escherichia coli, Klebsiella spp*., and *Enterobacter spp.* Isolates Collected in Russia within 2003-2007. Antibiotics and Chemotherapy. 2010;55(9-10):3-10. (In Russian).
11. Fursova NK, Astashkin EI, Knyazeva AI, Kartsev NN, Leonova ES, Ershova ON, et al. The spread of bla_{OXA-48} and $bla_{OXA-244}$ carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis* and *Enterobacter spp*. isolated in Moscow, Russia. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2015;14:46. DOI: 10.1186/s12941-015-0108-y

Информация об соавторах:

Лев Анастасия Игоревна, младший 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) 36-0079

Асташкин Евгений Ильич, кандидат медицинских наук, ведущий 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) 36-0079

Светоч Эдуард Арсеньевич, доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0079

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) 36-0079

Information about co-authors:

Anastasia I. Lev, junior researcher of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology departments, 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) 36-0079

Eugeny I. Astashkin, MD, PhD, leading researcher of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology departments, 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) 36-0079

Edward A. Svetoch, PhD, DSc (Vet.), professor, chief researcher of antimicrobial agents laboratory, Molecular Microbiology departments, 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) 36-0079

Nadezhda K. Fursova, PhD (Biol.), head of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology departments, 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) 36-0079

НОВОСТИ НАУКИ

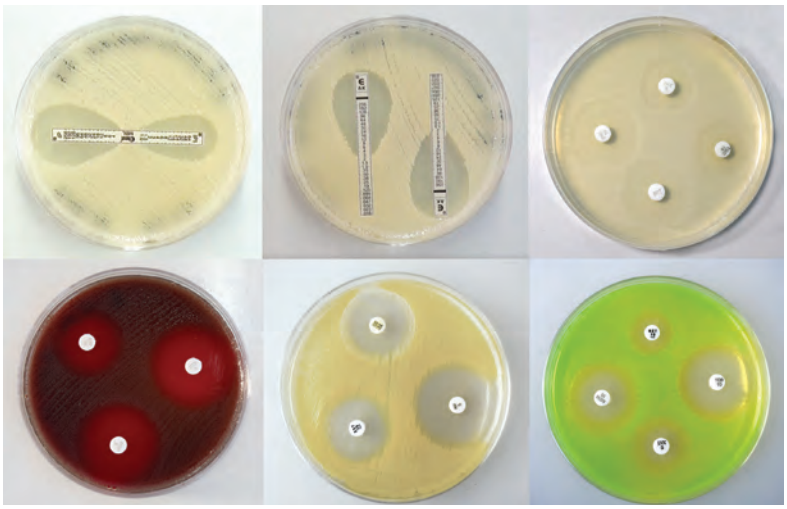
Агар Мюллера–Хинтон II

ФБУН ГНЦ ПМБ с конца 2017 года начал выпуск питательной среды для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, сухой (агар Мюллера–Хинтон II).

Питательная среда соответствует требованиям современных нормативных документов EUCAST и клинических рекомендаций «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам».

Агар Мюллера–Хинтон II стандартизирован по содержанию ионов Ca, Mg, Mn и Zn, имеет минимальную концентрацию тимина/тимидина.

Питательная среда зарегистрирована в качестве медицинского изделия и имеет регистрационное удостоверение №РЗН 2017/5962 от 10 июля 2017 года.



DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-33-35

Бактериология, 2018, том 3, №1, с. 33–35
Bacteriology, 2018, volume 3, No 1, p. 33–35

Санитарно-микробиологическое состояние вод малых водоемов Ленинградской области

П.А.Полистовская, К.П.Кинаревская, А.А.Бахта, А.Б.Балыкина, П.Д.Бохан

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Исследование санитарно-микробиологического состояния вод малых водоемов Ленинградской области показало наличие сапрофитных микроорганизмов в пределах от 0,061 до 0,203 тыс. кл./мл в воде Среднерогатского пруда, в воде пруда парка Авиаторов – от 0,059 до 0,256 тыс. кл./мл, в воде пруда Нагорного парка – от 0,064 до 0,232 тыс. кл./мл, в Южном озере – от 0,069 до 0,241 тыс. кл./мл. Количество сапрофитных микроорганизмов преобладало в придонном горизонте всех водоемов. Наиболее высокие показатели общего микробного числа (ОМЧ) имеют пруды в парке Авиаторов и Южное озеро системы Солдатских озер. Показатель общих колиформных бактерий (ОКБ) был в диапазоне от 31 до 61 КОЕ/мл на разных станциях отбора проб в воде Среднерогатского пруда, в воде пруда парка Авиаторов – от 49 до 59 КОЕ/мл, в воде пруда Нагорного парка – от 29 до 38 КОЕ/мл, в Южном озере – от 38 до 88 КОЕ/мл. Результаты определения ОКБ в воде исследуемых водоемов указали на превышение установленных нормативов для вод населенных пунктов у всех четырех водоемов.

Ключевые слова: общее микробное число, общие колиформные бактерии, санитарно-микробиологическое состояние вод, малые водоемы

Для цитирования: Полистовская П.А., Кинаревская К.П., Бахта А.А., Балыкина А.Б., Бохан П.Д. Санитарно-микробиологическое состояние вод малых водоемов Ленинградской области. Бактериология. 2018; 3(1): 33–35. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-33-35

Sanitary and microbiological status of waters in small water bodies in the Leningrad region

P.A.Polistovskaya, K.P.Kinarevskaya, A.A.Bakhta, A.B.Balykina, P.D.Bokhan

St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

The study of sanitary and microbiological condition of waters of small reservoirs of the Leningrad region showed the presence of saprophytic microorganisms in the range of 0.203 to 0.061 thousand cells/ml in water Srednerogatskyi pond, in the pond water Park of Aviators – from 0.059 to 0.256 thousand cells /ml, in the pond water of Nagornyy Park from 0.064 to 0.232 thousand cells/ml, in the South lake from 0.241 up to 0.069 thousand cells/ml. The number of saprophytic microorganisms predominated in the bottom horizon of all water bodies. The highest rates of TMC have a pond in the Park of Aviators and the southern lake of the Soldier's lake system. The CCB index ranged from 31 to 61 CFU / ml at different sampling stations in the water of the Srednerogatsky pond, in the water of the Aviator Park pond-from 49 to 59 CFU/ml, in the water of the pond of Nagornyy Park – from 29 to 38 CFU/ml, in the South lake – from 38 to 88 CFU/ml. The results of the determination of CCB in the water of the studied reservoirs indicated exceedances of standards for water settlements all four reservoirs.

Keywords: total microbial count, common coliform bacteria, sanitary and microbiological state of water, small ponds

For citation: Polistovskaya P.A., Kinarevskaya K.P., Bakhta A.A., Balykina A.B., Bokhan P.D. Sanitary and microbiological status of waters in small water bodies in the Leningrad region. Bacteriology. 2018; 3(1): 33–35. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-33-35

Возрастающая антропогенная нагрузка на водные экосистемы обуславливает необходимость их мониторинга и вместе с тем является основополагающей задачей сохранения водного потенциала страны. К сожалению, гидрометеослужба, осуществляющая наблюдение за состоянием водных объектов, охватывает только наиболее крупные и значимые с хозяйственной или рекреационной точки зрения водоемы. На малых же озерах исследования либо не проводятся вообще, либо периодичность наблюдений недостаточна, чтобы оценить изменения экосистемы под действием антропогенных факторов.

Нерациональное использование огромного водного потенциала страны продиктовано недостатком информации о функционировании экосистем малых водоемов. Детальное изу-

Для корреспонденции:

Полистовская Полина Александровна, ассистент кафедры биохимии и физиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины»

Адрес: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5
Телефон: (812) 388-4972
E-mail: 89111591172@mail.ru

Статья поступила 17.01.2018 г., принята к печати 30.03.2018 г.

For correspondence:

Polina A. Polistovskaya, assistant of the department of biochemistry and physiology, St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine

Address: 5 Chernigovskaya str., St. Petersburg, 196084, Russian Federation
Phone: (812) 388-4972
E-mail: 89111591172@mail.ru

The article was received 17.01.2018, accepted for publication 30.03.2018

чение водных объектов, в особенности малых озер и прудов, необходимо, в первую очередь, для определения направления их эксплуатации [1]. Например, для развития рыбоводства и рыболовства на ряде малых озер часто необходимо проведение рыбохозяйственной мелиорации. Однако мелиоративные мероприятия невозможны без тщательного исследования данных объектов.

Недостаток информации о санитарном состоянии вод приводит порой к тому, что для рекреационных нужд используются малые озера и пруды, качество вод в которых не соответствует по ряду показателей нормативам, предусмотренным законодательством, что может нанести существенный ущерб здоровью человека и животных. Степень воздействия водосбора на малые озера по интенсивности значительно выше, чем в случае крупных водоемов. Поэтому губительно действуют на малые озера не только застройка береговой линии, но и сброс в водоемы дренажных вод. Все это приводит к увеличению выноса в озера биогенных и загрязняющих веществ и нарушает естественные условия формирования стока на водосборе.

Экосистемы подавляющего большинства малых озер являются весьма уязвимыми. В результате хозяйственной деятельности озера теряют свое значение в качестве источников чистой воды. Деградация или исчезновение малых озер значительно обедняет биоразнообразие любого природного комплекса. Для разработки мер по восстановлению озер, направленных на снижение интенсивности их обмеления, зарастания, антропогенного эвтрофирования и загрязнения необходимы сведения об экологическом состоянии водоемов, поэтому было важно оценить экологическое состояние исследуемых объектов.

Цель настоящей работы – оценить современное санитарно-микробиологическое состояние ряда малых водоемов Ленинградской области.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись пруды Санкт-Петербурга и Ленинградской области: пруд в парке Авиаторов, Среднерогатский пруд, пруд в Нагорном парке и Южное озеро системы Солдатских озер.

Пробы отбирались у поверхности и в придонном горизонте в период открытой воды с периодичностью 2 нед с сентября по ноябрь 2016 г., а также в весенний период (март 2017 г.).

Санитарно-микробиологическое исследование включает данные по количеству бактерий, растущих на мясо-пептонном агаре (МПА), и количеству колиформных бактерий.

Отбор проб воды для санитарно-бактериологических исследований, определение общего количества микроорганизмов и бактерий группы кишечных палочек производились согласно общепринятым методикам [2].

Результаты исследования

Санитарно-микробиологический анализ вод показал, что количество сапрофитных микроорганизмов находилось в пределах от 0,061 до 0,203 тыс. кл./мл в воде Среднерогатского пруда, в воде пруда парка Авиаторов – от 0,059 до 0,256 тыс. кл./мл, в воде пруда Нагорного парка – от 0,064 до 0,232 тыс. кл./мл, в Южном озере – от 0,069 до 0,241 тыс. кл./мл.

Стоит отметить, что показатель общего микробного числа (ОМЧ) преобладает в придонном горизонте водоемов. Это связано с накоплением на дне органических веществ, питающих микроорганизмы. Также нами были отмечены колебания показателя с течением времени. При исследовании было выявлено, что наиболее богаты микробной флорой пруд в парке Авиаторов и Южное озеро системы Солдатских озер.

При определении общих колиформных бактерий (ОКБ) в воде исследуемых объектов было обнаружено от 31 до 61 КОЕ/мл на разных станциях отбора проб в воде Среднерогатского пруда, в воде пруда парка Авиаторов – от 49 до 59 КОЕ/мл, в воде пруда Нагорного парка – от 29 до 38 КОЕ/мл, в Южном озере – от 38 до 88 КОЕ/мл. Результаты определения ОКБ в воде исследуемых водоемов указали на превышение установленных нормативов для вод населенных пунктов у всех четырех водоемов [3]. При этом стоит отметить, что показатель ОКБ в воде Южного озера выше, чем в воде других исследуемых водоемов.

Выводы

При санитарно-микробиологическом исследовании вод малых водоемов Ленинградской области (пруд в парке Авиаторов, Среднерогатский пруд, пруд в Нагорном парке, Южное озеро системы Солдатских озер) были определены такие показатели, как ОМЧ и ОКБ. Полученные данные исследуемых показателей вод позволяют сделать вывод о современном санитарно-гигиеническом состоянии водоемов, что включает в себя непригодность объектов анализа для рекреационной деятельности вследствие превышения установленных нормативов показателей ОМЧ и ОКБ.

Так как городские водоемы уязвимы, и антропогенное воздействие на них часто балансирует на грани емкости среды, превышение уровня загрязнения может привести к антропогенному эвтрофированию, поэтому необходимо проведение мониторинга таких водоемов, процедур по сохранению и оздоровлению водных биоценозов, а также снижение антропогенной нагрузки там, где это возможно.

Литература

1. Каурова ЗГ, Полистовская ПА. Оценка соответствия качества вод малых озер Васильково и Бабеха нормативам качества вод водоемов рыбохозяйственного назначения, Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2015;1:124-8.
2. Инешина ЕГ, Гомбоева СВ. Методические указания к лабораторному практикуму по курсам «Санитарная микробиология», «Санитарно-микробиологический контроль на производстве», КПВ «Микробиология». Улан-Удэ: Издательство ВСГТУ, 2006, 88 с.
3. СанПиН 2.1.5.980-00. 2.1.5. «Водоотведение населенных мест, санитарная охрана водных объектов. Гигиенические требования к охране поверхностных вод. Санитарные правила и нормы» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 22.06.2000) (с изм. от 04.02.2011, с изм. от 25.09.2014). Доступ из справ.-правовой системы "КонсультантПлюс".

References

1. Kaurova ZG, Polistovsky PA. Conformity assessment of water quality of small lakes vasilkovo and babeha cornflower water quality standards reservoirs fishery. Issues of Legal Regulation in Veterinary Medicine. 2015;1:124-8. (InRussian).
2. Ineshina EG, Gomboeva SV. Metodicheskie ukazaniya k laboratornomu praktikumu po kursam «Sanitarnaya mikrobiologiya», «Sanitarno-mikrobiologicheskii kontrol' na proizvodstve», KPV «Mikrobiologiya». Ulan-Ude, 2006, 88 p. (InRussian).
3. SanPiN 2.1.5.980-00. 2.1.5. «Vodootvedenie naselennykh mest, sanitarnaya okhrana vodnykh ob"ektov. Gigienicheskie trebovaniya k okhrane poverkhnostnykh vod. Sanitarnye pravila i normy» (utv. Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom RF 22.06.2000) (InRussian).

Информация о соавторах:

Кинаревская Катерина Петровна, ассистент кафедры биохимии и физиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины»
Адрес: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5
Телефон: (812) 388-4972
E-mail: dropdead93@mail.ru

Бахта Алеся Александровна, доцент кафедры биохимии и физиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины»
Адрес: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5
Телефон: (812) 388-4972
E-mail: kuklina.p@list.ru

Балыкина Анна Борисовна, доцент кафедры биохимии и физиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины»
Адрес: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5
Телефон: (812) 388-4972
E-mail: polpol.19@list.ru

Бохан Полина Дмитриевна, ассистент кафедры биохимии и физиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины»
Адрес: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5
Телефон: (812) 388-4972
E-mail: polinchi_95@mail.ru

Information about co-authors:

Katerina P. Kinarevskaya, assistant of the department of biochemistry and physiology, St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine
Address: 5 Chernigovskaya str., St. Petersburg, 196084, Russian Federation
Phone: (812) 388-4972
E-mail: dropdead93@mail.ru

Alesya A. Bakhta, associate professor of the department of biochemistry and physiology, St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine
Address: 5 Chernigovskaya str., St. Petersburg, 196084, Russian Federation
Phone: (812) 388-4972
E-mail: kuklina.p@list.ru

Anna B. Balykina, associate professor of the department of biochemistry and physiology, St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine
Address: 5 Chernigovskaya str., St. Petersburg, 196084, Russian Federation
Phone: (812) 388-4972
E-mail: polpol.19@list.ru

Polina D. Bokhan, assistant of the department of biochemistry and physiology, St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine
Address: 5 Chernigovskaya str., St. Petersburg, 196084, Russian Federation
Phone: (812) 388-4972
E-mail: polinchi_95@mail.ru

Анализ 3800-летних геномов *Yersinia pestis* предлагает происхождение бронзового века для бубонной чумы

Происхождение возбудителя чумы *Yersinia pestis* и ранние этапы его эволюции являются предметом фундаментальных исследований, учитывая его высокую вирулентность и смертность, возникшие в результате прошлых пандемий. Хотя самые ранние свидетельства заражения людей *Y. pestis* относят к позднему неолиту/бронзовому веку Евразия (LNBA, 5000–3500 лет назад), эти штаммы не содержат ключевых генетических компонентов, необходимых для адаптации блох, что делает способ их передачи и возникновения болезни у людей неясным. В данной работе были восстановлены древние геномы *Y. pestis* от людей периода поздней бронзы (~3800 лет назад) в Самарской области современной России. Показаны четкие различия между нашими новыми штаммами и линией LNBA. Предполагается, что полная способность к опосредуемой блохам передаче, вызывающей бубонную чуму, эволюционировала более чем на 1000 лет раньше, чем предполагалось ранее. Высказывается также предположение, что в эпоху бронзы было установлено несколько линий *Y. pestis*, некоторые из которых сохраняются до наших дней.

Spyrou M.A., Tukhbatova R.I., Wang C.-C., Valtueña A.A., Lankapalli A.K., Kondrashin V.V., et al. Analysis of 3800-year-old Yersinia pestis genomes suggests Bronze Age origin for bubonic plague. Nat Commun. 2018;9(1):2234. doi: 10.1038/s41467-018-04550-9

Ученые Национального института аллергии и инфекционных болезней показывают, как возбудитель туляремии вызывает заболевание

Они обнаружили, что трюки *F. tularensis* содержат митохондрии клеток, которые продуцируют энергию для клетки в двух разных фазах инфекции. В первые восемь часов заражения бактерии увеличивают активность митохондрий, что ингибирует гибель клеток и предотвращает воспаление клетки, чтобы избежать атаки иммунной системы. Через 24 ч бактерии нарушают функцию митохондрий, интенсивно делятся и распространяются по организму. Эти фундаментальные научные результаты могут сыграть определенную роль в разработке эффективных стратегий лечения.

Jessop F, Schwarz B, Heitmann E, Buntyn R, Wehrly T, Bosio CM. Temporal manipulation of mitochondrial function by virulent Francisella tularensis to limit inflammation and control cell death. Infect Immun. 2018 May 14. pii: IAI.00044-18. doi: 10.1128/IAI.00044-18.

Бактериология, 2018, том 3, №1, с. 36–44
Bacteriology, 2018, volume 3, No 1, p. 36–44

DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-36-44

Клонирование и экспрессия генов биосинтеза сидерофора иерсиниахелина *Yersinia pestis* в клетках *Escherichia coli*

Д.А.Кузнецова, О.Н.Подладчикова

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

Настоящее исследование посвящено изучению гидроксаматного сидерофора иерсиниахелина (Ych) возбудителя чумы *Yersinia pestis*. Целью работы были создание рекомбинантного штамма кишечной палочки – продуцента Ych, анализ экспрессии этого сидерофора в гетерологичном хозяине и оценка возможности использования рекомбинантного штамма для получения препарата Ych. В результате на основе плазмидного вектора сконструирована рекомбинантная плазмида, содержащая четыре гена биосинтеза Ych (аналоги *ypo*1529-1532) без собственного промотора, которые экспрессируются под контролем нерегулируемого железом векторного P_{lac} промотора. Рекомбинантная плазмида, введенная в штамм *E. coli*, не синтезирующий собственные сидерофоры, способствует значительной экспрессии Ych. Сравнение свойств рекомбинантного и контрольного штамма, содержащего векторную плазмиду, позволило заключить, что экспрессия Ych в клетках кишечной палочки способствует защите бактерий от реактивных соединений кислорода. Анализ продукции Ych рекомбинантным штаммом выявил его перспективность для выделения Ych и его дальнейшей характеристики.
Ключевые слова: Yersinia pestis, Escherichia coli, сидерофор иерсиниахелин, рекомбинантная плазмида

Для цитирования: Кузнецова Д.А., Подладчикова О.Н. Клонирование и экспрессия генов биосинтеза сидерофора иерсиниахелина *Yersinia pestis* в клетках *Escherichia coli*. Бактериология. 2018; 3(1): 36–44. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-36-44

Cloning and expression of *Yersinia pestis* yersiniachelin siderophore biosynthesis genes in *Escherichia coli*

D.A.Kuznetsova, O.N.Podladchikova

Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

The present study investigates the *Yersinia pestis* hydroxamate siderophore yersiniachelin (Ych). We aimed at obtaining the recombinant *E. coli* strain-producer of Ych and the analysis of the siderophore expression in the heterologous host as well as at the possible application of the recombinant strain for Ych isolation. As a result we constructed a recombinant plasmid which carried four genes of the Ych biosynthesis (*ypo*1529-1532 analogues) without their own promoter and being expressed under the control of Fe-independent vector P_{lac} promoter. When introduced into the strain which is unable to produce its own siderophores, the recombinant plasmid promoted significant Ych expression. The comparison of the recombinant and control strain carrying vector plasmid allowed us to conclude that Ych expression in *E. coli* protects bacteria from reactive oxygen species. The analysis of Ych production by the recombinant strain suggested that the strain is perspective for preparation and further characterization of Ych.
Keywords: Yersinia pestis, Escherichia coli, yersiniachelin siderophore, recombinant plasmid

For citation: Kuznetsova D.A., Podladchikova O.N. Cloning and expression of *Yersinia pestis* yersiniachelin siderophore biosynthesis genes in *Escherichia coli*. Bacteriology. 2018; 3(1): 36–44. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-36-44

Железо является существенным элементом в метаболизме патогенных бактерий, однако в организме животных его доступность ограничена низкой растворимостью в физиологических условиях и прочной связью с белками, которые выполняют функции неспецифической защиты хозяина от бактерий [1]. Повышение продукции этих белков в ответ на инфекцию является одним из элементов «пищевого иммунитета», который ограничивает доступность железа для бактерий [2]. Этот процесс способствует еще большему снижению концентрации свободного железа [3]. Недос-

Для корреспонденции:

Кузнецова Дарья Александровна, младший научный сотрудник, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-2703
E-mail: dariakuz3112@bk.ru

Статья поступила 23.01.2018 г., принята к печати 30.03.2018 г.

For correspondence:

Daria A. Kuznetsova, junior researcher, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute

Address: 117/40 M. Gorkogo str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: (863) 240-2703
E-mail: dariakuz3112@bk.ru

The article was received 23.01.2018, accepted for publication 30.03.2018

таток железа является для бактерий сигналом присутствия в организме хозяина, вследствие чего они перестраивают свой метаболизм [4]. Одним из первых этапов этой перестройки является секреция в среду низкомолекулярных хелаторов железа – сидерофоров, извлекающих этот элемент из комплексов с белками и доставляющих его бактериям [5, 6].

Известно, что сидерофоры вносят существенный вклад в развитие инфекционного процесса и являются признанными факторами вирулентности, выполняющими также множество других функций [7]. Они участвуют в поглощении ионов других «биологических» металлов и защищают бактерии от токсического действия ионов тяжелых металлов [8], обладают антиоксидантными свойствами [9], выполняют регуляторную функцию [10, 11]. В организме хозяина сидерофоры могут подавлять рост резидентной микрофлоры [12], способствовать выживанию бактерий в сыворотке крови [13], препятствовать ассимиляции фагоцитами железа, необходимого для их бактерицидного действия [14], стимулировать продукцию цитокинов [15], оказывать токсическое действие на ткани хозяина [16], а также служить секретируемым токсином, разрушающим митохондрии фагоцитов [17].

Многие патогены продуцируют несколько сидерофоров, которые выполняют разные функции [18], активных в отношении разных источников железа в организме хозяина и на разных этапах инфекции [19, 20]. В литературе накапливается все больше данных о том, что способность патогенных бактерий продуцировать множественные сидерофоры коррелирует с тяжестью вызываемого патогенами заболевания. Прежде всего, это связано с многообразием функций сидерофоров во время инфекции, а также с их разным сродством к белку иммунной системы сидерокалину-2, который продуцируется эпителиальными клетками и нейтрофилами и инактивирует некоторые сидерофоры [21]. По современным представлениям, комбинация продуцируемых патогеном сидерофоров определяет его «репликативные ниши» и модулирует реакцию хозяина на инфекцию [7].

Важная роль сидерофоров для вирулентности бактерий подтверждается и многолетними исследованиями фенолятного сидерофора иерсиниабактина (Ybt) *Yersinia pestis*, который кодируется островом высокой патогенности (HPI-1) в составе нестабильного хромосомного pgm локуса [22]. Хотя этот сидерофор многие годы исследуется как на модели *Y. pestis*, так и других синтезирующих его патогенных энтеробактерий, у него продолжают обнаруживаться все новые функции, и механизм его участия в патогенезе чумы остается предметом изучения. У Ybt выявлена антиоксидантная активность [23], а также способность связывать ионы цинка [24] и меди, в комплексе с которой он проявляет активность супероксид-дисмутазы, снижающей токсичность радикалов и способствующей выживанию бактерий в макрофагах [25]. Эти исследования показали, что Ybt необходим возбудителю чумы не только для ассимиляции железа в организме млекопитающих, но и для защиты бактерий от бактерицидного действия систем врожденного иммунитета.

Многие годы Ybt считался единственным сидерофором *Y. pestis*, поскольку штаммы, не синтезирующие Ybt, на индикаторной среде для выявления сидерофоров [26] не проявляют сидерофорной активности [27]. Однако в секвенированных геномах разных штаммов *Y. pestis* выявлены гены биосинтеза и транспорта и других сидерофоров. Экспрессия этих генов *in vitro* и *in vivo* подтверждается результатами анализа данных транскриптомных и протеомных исследований [28]. Тем не менее сами сидерофоры не были выделены и охарактеризованы, и их роль в физиологии возбудителя чумы неизвестна.

Наши исследования [29] показали, что *Y. pestis* действительно синтезирует еще один, гидроксаматный сидерофор иерсиниахелин (Ych), который кодируется хромосомным ysu локусом, присутствующим у всех секвенированных штаммов *Y. pestis*. Структура Ych и его роль в физиологии *Y. pestis* в настоящее время не установлены. Неизвестно, участвует ли он в ассимиляции железа и других биологических металлов или выполняет какую-либо другую из множества свойственных сидерофорам функций. Для ответа на эти вопросы необходимо иметь препаративные количества Ych, которые невозможно получить из природных штаммов *Y. pestis*, которые в лабораторных условиях синтезируют лишь незначительные количества Ych.

В цели настоящего исследования входило создание рекомбинантного штамма кишечной палочки – продуцента Ych, анализ экспрессии этого сидерофора в гетерологичном хозяине и оценка возможности использования рекомбинантного штамма для выделения Ych.

Материалы и методы

Штаммы и питательные среды. Конструирование рекомбинантной плазмиды, содержащей гены биосинтеза Ych, было проведено в штамме *E. coli* Strata (Stratagene, США). Этот штамм резистентен к стрептомицину и содержит мутацию в гене β-галактозидазы lacZΔM15. Кроме того, штамм несет мутации в генах эндонуклеазы (*endA*) и рекомбиназы (*recA*) и не способен к рестрикции чужеродных фрагментов ДНК. Для экспрессии рекомбинантного Ych использован штамм *E. coli* H1884, не синтезирующий собственный сидерофор энтеробактин (штамм получен от д-ра А.Ракина, Германия).

Культуры бактерий выращивали в жидких и на плотных питательных средах LB (DIFCO, США), Хоттингера (ФКУЗ РостНИПЧИ) и M9, в которую при необходимости добавляли соли трехвалентного железа в концентрации 100 мкМ. Сидерофорную активность штаммов определяли на универсальной индикаторной среде для выявления сидерофоров [26]. Во все среды добавляли антибиотик ампициллин (50 мкг/мл).

Праймеры и векторная плазмида. Праймеры для получения ПЦР-копии генов биосинтеза Ych (*p1529fov* и *p1532rev*) были разработаны в настоящей работе с помощью программы Vector NTI на основе последовательности нуклеотидов генома секвенированных штаммов *Y. pestis*, представленных в общедоступных базах данных. Для анализа рекомбинантной плазмиды с помощью ПЦР, кроме этих праймеров, дополнительно использовали праймер *pM13rev*, который предложен фирмой Stratagene (США). Структура праймеров представлена в таблице 1.

В качестве вектора для клонирования генов биосинтеза Ych использовали плазмиду pSC-A-amp/kan (Stratagene,

Таблица 1. **Использованные в работе праймеры**

Название	Структура	Происхождение
pM13 rev	5` CAGGAAACAGCTATGACC 3`	StrataClone
p1529fov	5` CCAAGTTCCTGCATTAGACAGA 3`	Настоящее исследование
p1532rev	5` CGTTGCCGGATCATTACTGACCCTGAAT 3`	Настоящее исследование

Таблица 2. **Режим амплификации ДНК с праймерами *p1529f* и *p1532r***

Операция	Температура, °С	Время	Количество циклов
Начальная денатурация	98	4 мин	1
Денатурация	98	20 сек	
Отжиг	55	30 сек	25
Элонгация	72	4 мин	
Досинтез	72	4 мин	1

США), содержащую ген α-пептида β-галактозидазы (lacZ), с участками для клонирования фрагментов ДНК. При встраивании рекомбинантного фрагмента в вектор α-пептид не синтезируется, что позволяет производить отбор рекомбинантных клонов по отсутствию β-галактозидазной активности на индикаторной среде (2% X-gal).

Конструирование рекомбинантной плазмиды. ПЦР-копия генов, кодирующих биосинтез Ych, была получена с помощью праймеров *p1529f* и *p1532r* на матрице хромосомной ДНК, выделенной из вакцинного штамма *Y. pestis* EV76. Для ПЦР была использована ДНК-полимераза Pfu (Promega Corporation, США), совершающая минимальное количество ошибок при амплификации. Условия получения ПЦР-копии генов биосинтеза Ych представлены в таблице 2.

Полученный ПЦР-фрагмент длиной 5,63 т.п.н. был клонирован в клетках *E. coli* Strata в составе плазмидного вектора pSC-A-amp/kan (4,3т.п.н.) с помощью набора для клонирования ПЦР-продуктов StrataClone (Stratagene, США). Лигирование фрагмента с вектором, трансформацию клеток и отбор рекомбинантных клонов проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя набора. В качестве контроля использовали векторную плазмиду pSC-A-amp/kan. Препараты векторной и рекомбинантной (pSC-A-5EV) плазмид были получены из клеток *E. coli* Strata с помощью набора для выделения плазмид (Fermentas, EU). Препаратами трансформировали штамм *E. coli* H1884 методом электропорации. Выявление в клетках трансформантов векторной и рекомбинантной плазмид проводили путем гель-электрофореза в агарозном геле тотальной клеточной ДНК, а также с помощью ПЦР с праймерами *pM13rev* (комплементарен векторной ДНК) и *p1532rev* (комплементарен 3`-концу встроенного в вектор фрагмента ДНК).

Выделение рекомбинантного Ych. Для оценки возможности выделения Ych из рекомбинантного штамма была использована методика выделения сидерофоров гидроксаматного типа [30]. Для этого по 1 мл суспензии (10^9 мк/мл) контрольного и рекомбинантного штаммов, выращенных на агаре LB при 37°С, засевали в 25 мл минимальной среды М9 и инкубировали 72 ч с аэрацией при 26°С. Бактерии осаждали центрифугированием при 8000 об/мин 15 мин, супернатант отбирали и фильтровали через нитроцеллюлозный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм для удаления оставшихся бактерий. Фильтраты экстрагировали 10 мл бензилового спирта, спиртовую фракцию отделяли в делительной воронке и смешивали с 50 мл этилового эфира и 2 мл воды. Водную фазу отделяли в делительной воронке и концентрировали в вакуумном роторном испарителе до объема 0,5 мл. Препараты, полученные из контрольного и рекомбинантного штаммов, анализировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах силикагеля с пришитой фазой С3 (Плазмохром RP3, МПО «Манометр», Россия). В качестве мобильной фазы при восходящей хроматографии использовали 60% этанол. Хроматограммы проявляли с помощью паров йода.

Результаты и обсуждение

Конструирование рекомбинантной плазмиды, содержащей гены биосинтеза иерсиниахелина

С целью конструирования рекомбинантной плазмиды, способствующей экспрессии Ych, была использована ПЦР-копия четырех кодирующих биосинтез Ych генов (*ypo1529-1532*), которая была синтезирована с помощью праймеров *p1529f* и *p1532r* на матрице хромосомной ДНК, выделенной из вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 (рис. 1А). При этом ПЦР продукт длиной 5,63 т.п.н. не содержал регуляторных элементов экспрессии генов (промотора и оператора, узнаваемого репрессором Fur), ответственных за регуляцию биосинтеза Ych концентрацией железа в среде. В продукте также отсутствовали гены транспортных белков, необходимых для поглощения нагруженного железом Ych бактериями, и ген ферриредуктазы (*ypo1528*), обеспечивающей освобождение железа из его комплекса с Ych внутри бактерий.

Полученный ПЦР-продукт был лигирован с помощью набора для клонирования ПЦР-продуктов (Stratagene, США) с плазмидным вектором pSC-A-amp/kan (4,3 т.п.н.), и лигазная смесь была использована для трансформации штамма *E. coli* Strata. В качестве контроля использовали препарат векторной плазмиды pSC-A-amp/kan. Анализ полученных клонов путем электрофореза тотальной клеточной ДНК в агарозном геле показал, что в синих клонах выявлялась плазмида, соответствующая по подвижности вектору, а в белых – рекомбинантная плазмида pSC-A-5EV с меньшей подвижностью в геле, следовательно, с большей молекулярной массой за счет рекомбинантного фрагмента ДНК (рис. 2А).

Для подтверждения наличия генов биосинтеза Ych в рекомбинантной плазмиде был проведен анализ двух штаммов с помощью ПЦР (рис. 2Б). В контрольном штамме, содержащем векторную плазмиду, отсутствует продукт амплификации с праймерами *pM13r* (комплементарен векторной ДНК) и *p1532r* (комплементарен 3`-концу рекомбинантного фрагмента ДНК). В то же время рекомбинантный штамм дает ПЦР-фрагмент длиной около 6 т.п.н., соответствующий по длине теоретически рассчитанному фрагменту ДНК (5,63 т.п.н. от рекомбинантного фрагмента + 0,15 т.п.н. от векторной ДНК). Эти данные свидетельствовали о встраивании рекомбинантного фрагмента ДНК в правильной ориентации по отношению к векторному промотору.

Таким образом, генетические эксперименты показали, что нами была получена рекомбинантная плазмида, содер-

жащая гены биосинтеза Ych под контролем векторного промотора Plac, активность которого не подавляется белком-репрессором Fur и не зависит от наличия в среде железа. Эта плазмида была использована в дальнейшей работе для получения штамма-продуцента Ych, а векторная плазмида pSC-A-amp/kan во всех экспериментах служила контролем.

Получение штамма *E. coli* – продуцента иерсиниахелина

Для получения продуцента Ych в качестве хозяина для рекомбинантной плазмиды pSC-A-5EV был использован экспериментальный штамм *E. coli* H1884, не синтезирующий собственный сидерофор энтеробактин вследствие делеции генов биосинтеза энтеробактина entD и entF. Отсутствие синтеза собственного сидерофора в штамме-продуценте, полученном из *E. coli* H1884, гарантирует получение из него более чистого препарата Ych. Кроме того, использование этого авирулентного штамма для получения Ych обеспечивает безопасность всех биохимических манипуляций при выделении сидерофора.

Трансформация штамма *E. coli* H1884 препаратом рекомбинантной плазмиды позволила получить предполагаемый штамм-продуцент Ych, а в результате трансформации векторной плазмидой pSC-A-amp/kan – контрольный штамм.

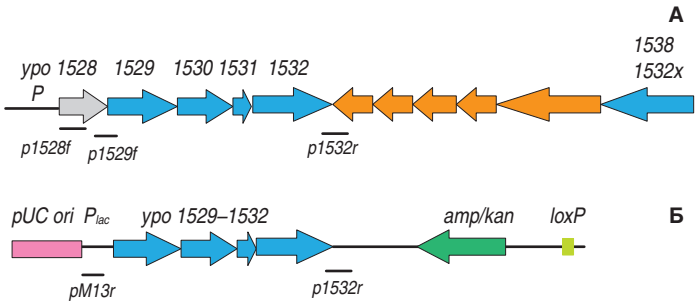


Рис. 1. **Клонирование генов биосинтеза Ych в плазмидном векторе pSC-A-amp/kan:** А – генетическая карта кластера генов, ответственных за биосинтез и транспорт Ych. Синим цветом обозначены гены, ответственные за биосинтез Ych, желтым цветом – за транспорт ферри-Ych в бактерии. Показаны праймеры (*p1529f* и *p1532r*), использованные для получения ПЦР-копии биосинтетических генов *Ych*; Б – генетическая карта рекомбинантной плазмиды pSC-A-5EV. Синим цветом обозначен рекомбинантный фрагмент, полученный с помощью ПЦР из штамма *Y. pestis* EV76.

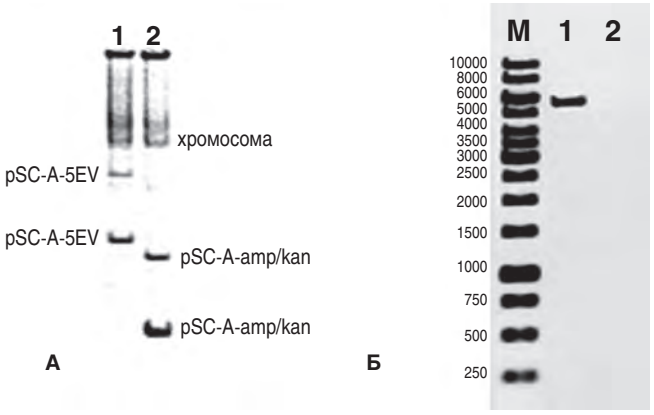


Рис. 2. **Генетический анализ штамма *E. coli* Strata, содержащего векторную плазмиду pSC-A-amp/kan (2) и рекомбинантную плазмиду pSC-A-5EV (1):** А – электрофореграмма тотальной клеточной ДНК штаммов в 0,8% агарозном геле; Б – ПЦР-анализ штаммов с помощью праймеров *pM13r* и *p1532r*. М – ДНК-маркеры (п.н.).

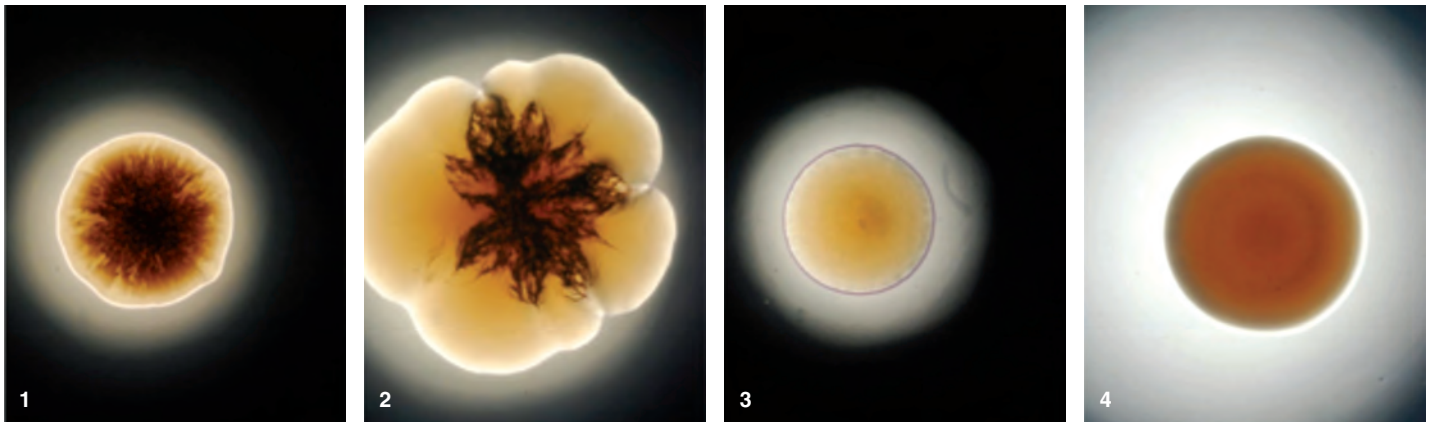


Рис. 3. **Морфология колоний штамма *E. coli* H1884, содержащего рекомбинантную плазмиду pSC-A-5EV (1, 2) и векторную плазмиду pSC-A-amp/kan (3, 4), при температуре 26°C (1,3) и 37°C (2, 4) и времени выращивания 48 ч.**

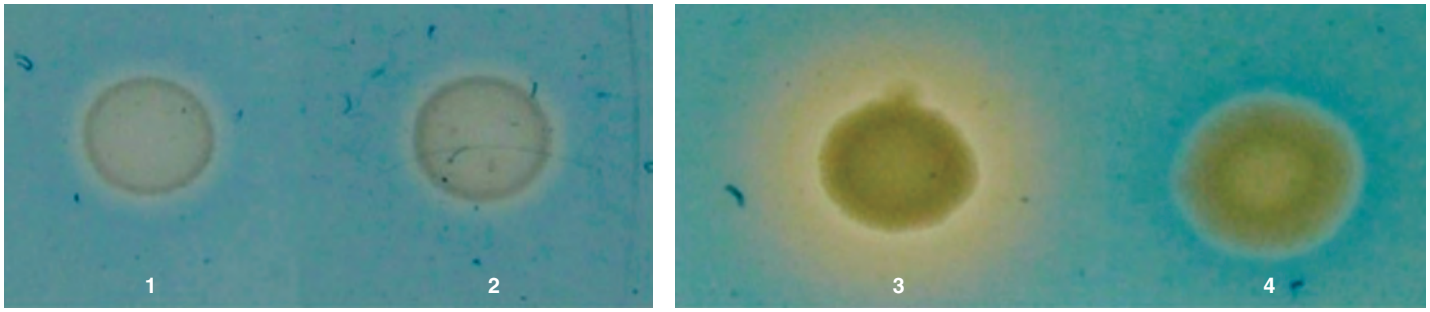


Рис. 4. **Сидерофорная активность контрольного (2, 4) и рекомбинантного (1, 3) штаммов, выращенных в течение 48 ч на CAS-агаре при температуре 37°C (1, 2) и 26°C (3, 4).**

Анализ штаммов, выращенных при разных температурах (26°C и 37°C) на среде LB, выявил значительные различия между ними по морфологии колоний. Так, в отличие от контрольного штамма, рекомбинантный образовывал колонии, внутри которых наблюдался коричневый преципитат, наиболее выраженный при 37°C (рис. 3). Можно предположить, что эта особенность является следствием накопления внутри клеток сидерофора, связанного с железом. Для подтверждения этого предположения требуются дальнейшие исследования.

Для доказательства продукции Ych рекомбинантным штаммом проводили его сравнение с контрольным штаммом на универсальной индикаторной среде (CAS-агар) для выявления сидерофоров (рис. 4). Как выяснилось, оба штамма не проявляли сидерофорной активности при выращивании на этой среде при 37°C. При этом сидерофорная активность регистрировалась в лизатах бактерий рекомбинантного штамма (данные не показаны). Хотя для *E. coli* температурный оптимум роста и осуществления всех жизненно важных функций – 37°C, при этой температуре сидерофор не выделялся в среду, а оставался внутри клеток. В то же время при выращивании рекомбинантного штамма на CAS-агаре при 26°C сидерофор секретировался в среду.

В отличие от контрольного штамма, не обладающего сидерофорной активностью, рекомбинантный штамм на CAS-агаре образовывал большую зону просветления вокруг посева за счет выделения Ych в среду (рис. 4). Эти результаты свидетельствовали о том, что выделение сидерофора в среду происходит только при 26°C. Очевидно, при этой температуре рекомбинантный штамм включает какие-то неспецифические системы экспорта низкомолекулярных веществ.

Сравнительный анализ контрольного и рекомбинантного штаммов *E. coli* H1884

Выращивание контрольного и рекомбинантного штаммов в жидкой минимальной питательной среде M9 при 26°C и 37°C показало, что они не росли на этой среде в течение всего периода наблюдения (7 сут). Аналогичные результаты были получены и при выращивании штаммов на пластинах агара со средой M9. По-видимому, это было связано с тем, что оба штамма не синтезируют катехолатный сидерофор энтеробактин, необходимый для ассимиляции железа в железодефицитных условиях. При этом экспрессия рекомбинантным штаммом Ych не способствовала росту штамма, поскольку у него отсутствует рецептор Ych, необходимый для связывания и транспорта комплекса Ych с железом внутрь клеток. Полученные результаты согласуются с данными C. Adler et al. [9], которые отмечали отсутствие роста на минимальной среде M9 у мутанта *E. coli*, не продуцирующего сидерофор энтеробактин.

Стимуляции роста обоих штаммов при 26°C и 37°C способствовало добавление в жидкую или плотную среду M9 солей трехвалентного железа в концентрации 100 мкМ.

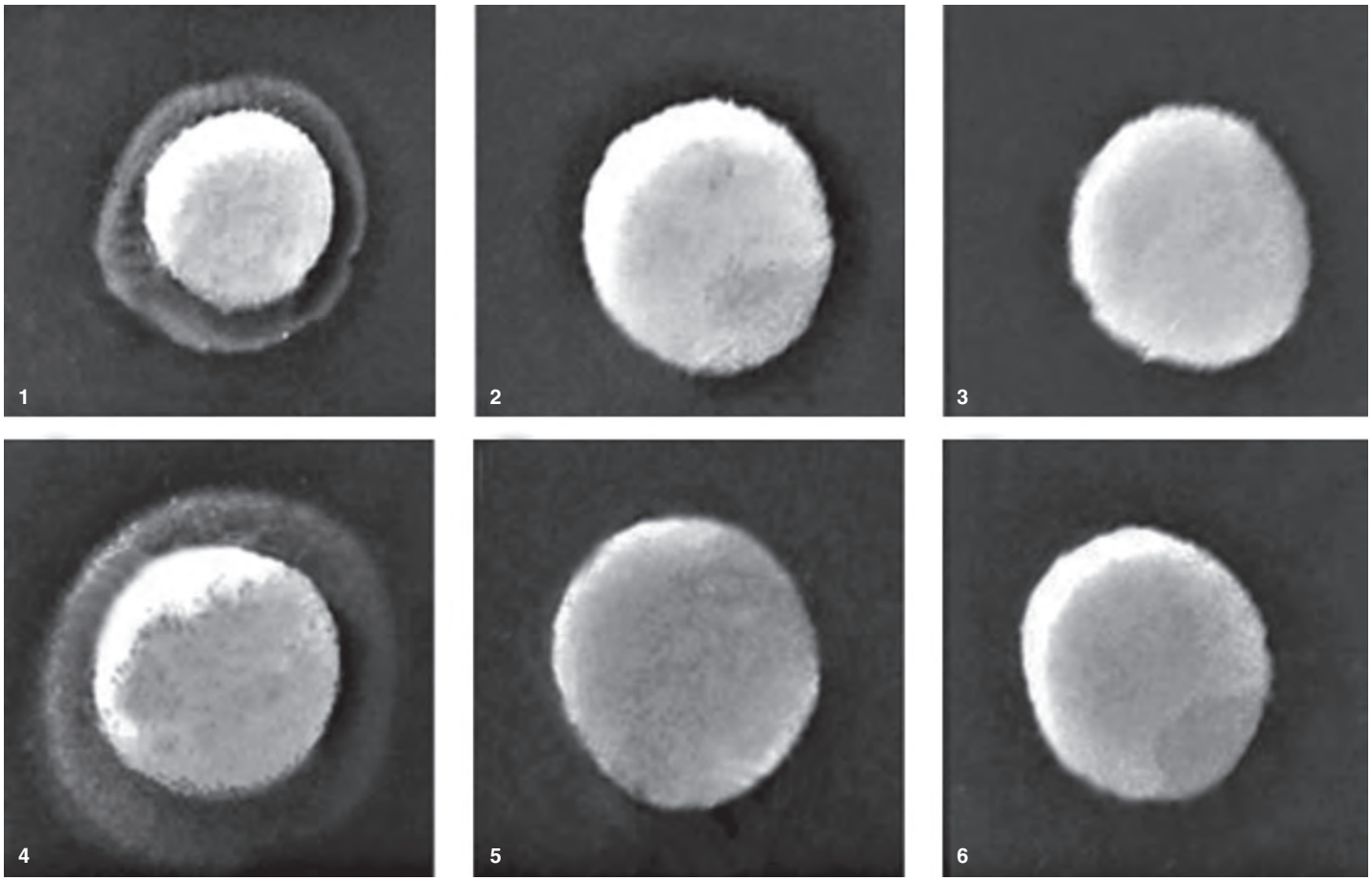


Рис. 5. **Рост контрольного (1, 2, 3) и рекомбинантного (4, 5, 6) штаммов на агаре M9 после добавления к посевам дисков, пропитанных раствором хлорида трехвалентного железа различной концентрации: 0,1 mM (1, 4), 1 mM (2, 5), 10 mM (3, 6).**

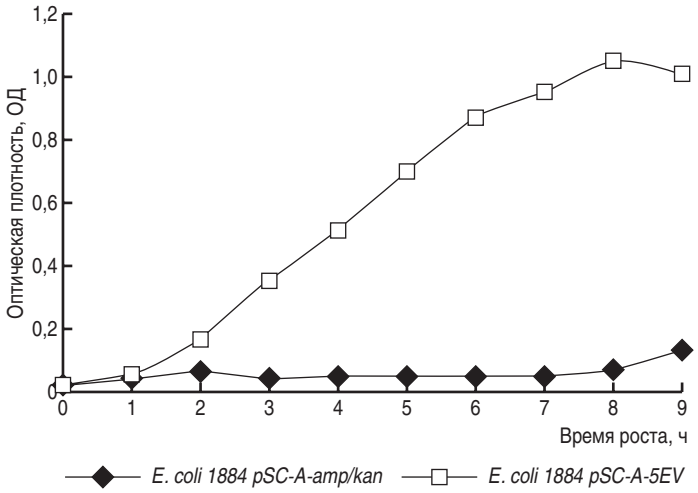


Рис. 6. **Кривые роста контрольного и рекомбинантного штаммов при 37°C в жидкой питательной среде LB с аэрацией (шуттелирование при 150 rpm).**

По-видимому, в такой концентрации железо может способствовать росту сидерофорнегативных мутантов за счет включения низкоаффинных систем транспорта. На рисунке 5 приведены результаты эксперимента, в котором на посевы двух штаммов на агаре М9 накладывали диски, пропитанные раствором хлорида трехвалентного железа различной концентрации. И в этом случае раствор концентрацией 100 мкМ стимулировал рост обоих штаммов. Однако увеличение концентрации трехвалентного железа до 1–10 мМ снимало стимулирующий эффект в отношении обоих штаммов, очевидно из-за токсичности высоких концентраций Fe^{3+}, которые, как известно, способствуют образованию реактивных соединений кислорода в реакции Хабер-Вайса [31]. Вышеописанные эксперименты не выявили различий между контрольным и рекомбинантным штаммом и продемонстрировали зависимость их роста от наличия в среде железа.

Значительные различия между штаммами были выявлены при их выращивании в средах с достаточным содержанием железа (LB, M9+Fe^{3+}) в условиях аэрации. Оказалось, что при аэрации контрольный штамм отставал от рекомбинантного по скорости роста, главным образом на начальных этапах. Особенно наглядно эти различия проявлялись при выращивании штаммов при 37°C с аэрацией (рис. 6) и не наблюдались при выращивании бактерий в микроаэрофильных условиях (без аэрации).

Эти данные позволяли предположить, что экспрессия Ych рекомбинантным штаммом защищает бактерии от реактивных соединений кислорода. Чтобы в этом убедиться, проанализировали чувствительность двух штаммов к перекиси водорода. Для этого суспензии двух штаммов, предварительно выращенных в жидкой среде LB при 37°C, высевали на пластины агара, в центр которых помещали бумажный диск, пропитанный 3% раствором перекиси водорода. Через 24 ч выращивания при 37°C на агаре вокруг дисков отмечалась зона отсутствия роста бактерий, диаметр которой был существенно меньше у рекомбинантного, чем у контрольного штамма (рис. 7). Интересно, что эти различия были не столь выражены у бактерий, предварительно выращенных при 26°C, то есть в условиях, способствующих выделению Ych в среду. Вышеописанные различия между штаммами указывали на возможную роль Ych в качестве антиоксиданта, способствующего снижению чувствительности бактерий к бактерицидному действию перекиси водорода.

Об антиоксидантной активности Ych можно было судить и по результатам действия двухвалентного железа на посевы двух штаммов на агар М9. Так, использование в экспериментах для стимуляции роста контрольного и рекомбинантного штаммов соли двухвалентного железа выявило значительные различия между штаммами (рис. 8). Оказалось, что Fe^{2+} стимулирует рост только рекомбинантного штамма в концентрации до 1 мМ, но не способствует росту контрольного штамма. Как известно, двухвалентное железо обладает более высокой, чем трехвалентное железо, прооксидантной

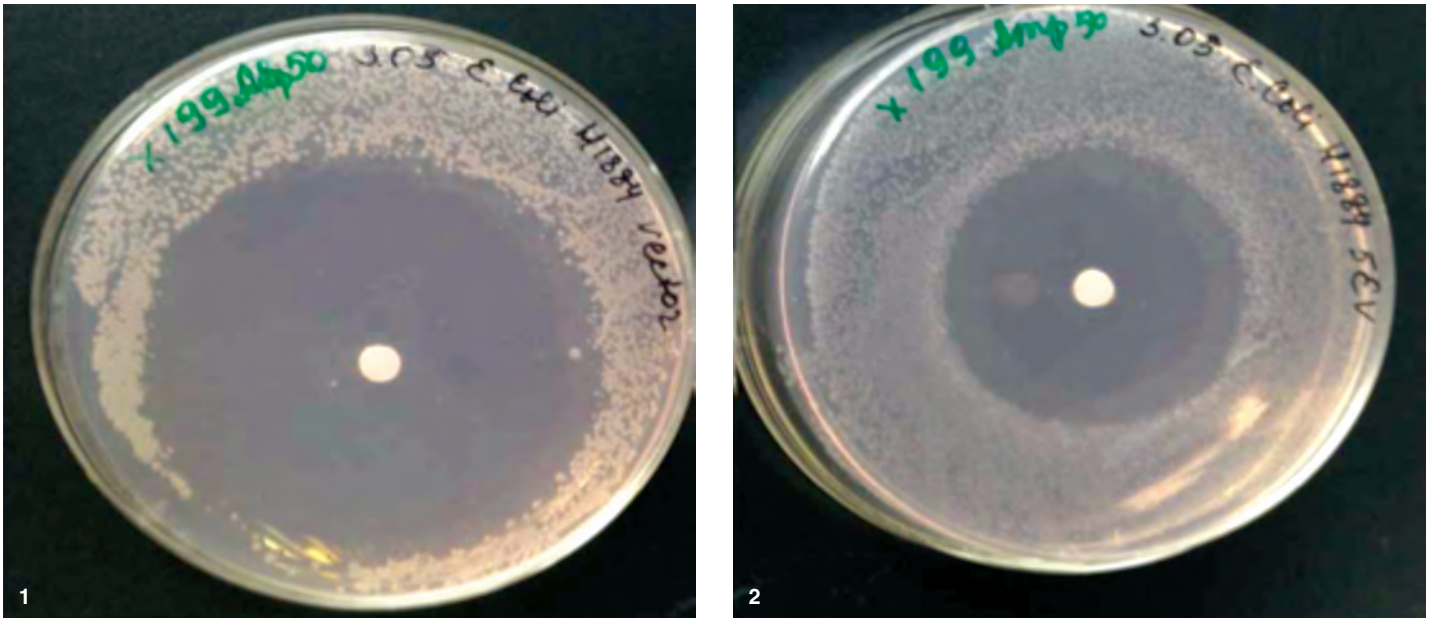


Рис. 7. **Влияние перекиси водорода на рост штамма *E. coli* H1884, содержащего векторную (1) и рекомбинантную (2) плазмиды.**

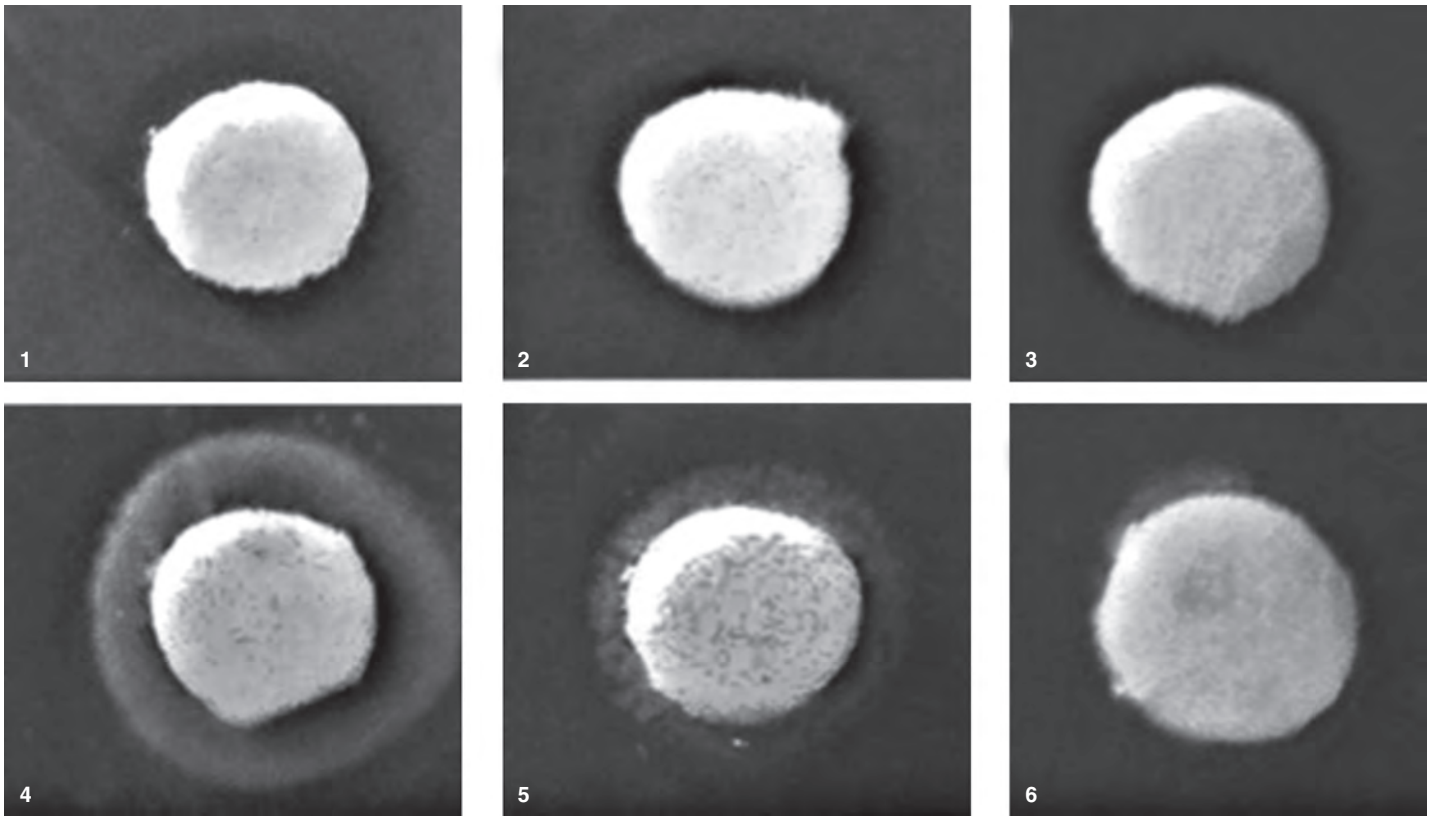


Рис. 8. **Рост при 37°С контрольного (1, 2, 3) и рекомбинантного (4, 5, 6) штаммов на агаре М9 после добавления к посевам дисков, пропитанных раствором сульфата двухвалентного железа различной концентрации: 0,1 mM (1, 4), 1 mM (2, 5), 10 mM (3, 6).**

активностью, поскольку в присутствии кислорода образует наиболее активные гидроксил-радикалы в реакции Фентона [31]. Поэтому ионы Fe^{2+} токсичны для бактерий, не обладающих мощными антиоксидантными механизмами. По-видимому, снижение токсичности двухвалентного железа в присутствии Ych дает возможность рекомбинантному штамму поглощать железо с помощью имеющихся у кишечной палочки сидерофор-независимых систем ассимиляции двухвалентного железа.

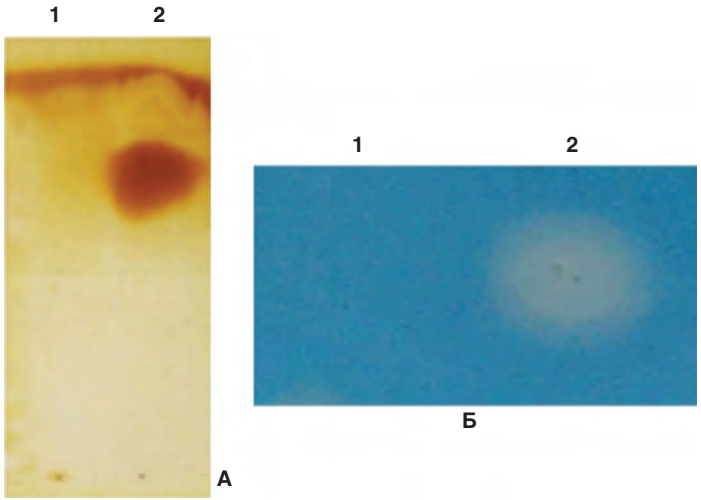


Рис. 9. **Анализ препаратов Ych, полученных из контрольного (1) и рекомбинантного (2) штамма:** А – ТСХ-анализ препаратов на пластинах силикагеля с пришитой фазой С3. Мобильная фаза – 60% этанол, детекция в парах йода; Б – сидерофорная активность препаратов на CAS-агаре.

Полученные данные указывали на то, что имеющийся в рекомбинантном штамме Ych не способствует поглощению железа в железодефицитной среде М9 из-за отсутствия рецептора сидерофора. При этом Ych обладает антиоксидантной активностью, стимулируя рост бактерий в присутствии прооксидантов (аэрация, перекись водорода, соли двухвалентного железа). Антиоксидантная активность обнаружена у целого ряда бактериальных и дрожжевых сидерофоров. Особенно выражена она у энтеробактерий, синтезирующих катехолатные сидерофоры типа энтеробактина [9, 32]. Но гидроксаматные сидерофоры также обладают подобными свойствами [33] за счет наличия в них остатков гидроксамовых кислот [34]. Интересно, что антиоксидантная активность у двух типов сидерофоров проявлялась только при их внутриклеточной локализации. Результаты наших экспериментов также свидетельствуют о том, что Ych, когда он находится главным образом внутри клеток (при 37°С), проявляет более выраженную антиоксидантную активность, чем тогда, когда его значительная часть выделяется в среду (при 26°С).

Оценка возможности использования рекомбинантного штамма для выделения иерсиниахелина

Выращивание контрольного и рекомбинантного штамма в различных условиях позволило определить, что Ych выделяется штаммом-продуцентом в культуральную среду при 26°С в жидкой среде М9, содержащей 100 мкМ трехвалентного железа. В этих условиях два штамма выращивали в течение 3 сут, и из культуральных сред получали препараты по методике, описанной в Материалах и методах.

Анализ полученных таким образом препаратов с помощью восходящей тонкослойной хроматографии на пластинах силикагеля (рис. 9А) показал, что, в отличие от препарата, полученного из контрольного штамма, препарат из рекомбинантного штамма содержал компонент с Rf 0,7, окрашивающийся йодом.

Сидерофорную активность полученных препаратов тестировали на CAS-агаре, на который наносили анализируемые растворы. Результат учитывали после 5 ч инкубации при 26°С. О наличии сидерофорной активности у препаратов судили по появлению желтого пятна на месте нанесения препарата на зеленую индикаторную среду (рис. 9Б). Сравнение препаратов, полученных из контрольного и рекомбинантного штаммов, выявило, что препарат из рекомбинантного штамма, в отличие от препарата из контрольного штамма, обладал сидерофорной активностью на CAS-агаре.

Таким образом, результаты исследований показали, что рекомбинантный штамм синтезирует и при 26°С выделяет в среду значительные количества Ych и может быть использован в качестве штамма-продуцента этого сидерофора. Апробированная методика может быть применена в дальнейших экспериментах для получения препаративных количеств Ych для изучения структуры, функции и роли этого сидерофора в физиологии и патогенности возбудителя чумы.

Финансирование

Работа выполнена за счет базового финансирования ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Благодарность

Авторы выражают признательность доктору А.Ракину (Институт гигиены и медицинской микробиологии Макса фон Петтенкофера, Мюнхен, Германия) за штамм E. coli H1884.

Литература/References

1. Cassat JE, Skaar EP. Iron in infection and immunity. Cell Host Microbe. 2013 May 15;13(5):509-519. DOI: 10.1016/j.chom.2013.04.010
2. Parrow NL, Fleming RE, Minnick MF. Sequestration and scavenging of iron in infection. Infect Immun. 2013 Oct;81(10):3503-14. DOI: 10.1128/IAI.00602-13
3. Becker KW, Skaar EP. Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen. FEMS Microbiol Rev. 2014 Nov;38(6):1235-49. DOI: 10.1111/1574-6976.12087
4. Skaar EP. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. PLoS Pathog. 2010 Aug 12;6(8):e1000949. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000949
5. Hider RC, Kong X. Chemistry and biology of siderophores. Nat Prod Rep. 2010 May;27(5):637-57. DOI: 10.1039/b906679a.
6. Sah S, Singh R. Siderophore: structural and functional characterization. A comprehensive review agriculture (Poľnohospodárstvo). 2015;61(3):97-114.
7. Holden V, Bachman MA. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. Metallomics. 2015 Jun;7(6):986-95. DOI: 10.1039/c4mt00333k
8. Schalk J, Hannauer M, Braud A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. Environ Microbiol. 2011 Nov;13(11):2844-54. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02556.x
9. Adler C, Corbalan NS, Peralta DR, Pomares MF, de Cristóbal RE, Vincent PA. The alternative role of enterobactin as an oxidative stress protector allows *Escherichia coli* colony development. PLoS One. 2014 Jan 2;9(1):e84734. DOI: 10.1371/journal.pone.0084734.
10. Llamas MA, Sparrius M, Kloet R, Jiménez CR, Vandenbroucke-Grauls C, Bitter W. The heterologous siderophores ferrioxamine B and ferrichrome activate signaling pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2006 Mar;188(5):1882-91. DOI: 10.1128/JB.188.5.1882-1891.2006
11. Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 May 14;99(10):7072-7. DOI: 10.1073/pnas.092016999
12. Fgaier H, Eberl HJ. A competition model between *Pseudomonas fluorescens* and pathogens via iron chelation. J J Theor Biol. 2010 Apr 21;263(4):566-78. DOI: 10.1016/j.jtbi.2009.12.003.
13. Hissen AHT, Chow JMT, Pinto LJ, Moore MM. Survival of *Aspergillus fumigatus* in serum involves removal of iron from transferrin: the role of siderophores. Infect Immun. 2004 Mar;72(3):1402-8.
14. Britigan BE, Rasmussen GT, Olakanmi O, Cox CD. Iron acquisition from *Pseudomonas aeruginosa* siderophores by human phagocytes: an additional mechanism of host defense through iron sequestration. Infect Immun. 2000 Mar;68(3):1271-5.
15. Varesio L, Battaglia F, Raggi F, Ledda B, Bosco MC. Macrophage-inflammatory protein-3α/CCL-20 is transcriptionally induced by the iron chelator desferrioxamine in human mononuclear phagocytes through nuclear factor (NF)-kB. Mol Immunol. 2010 Jan;47(4):685-93. DOI: 10.1016/j.molimm.2009.10.031
16. Rada B, Jendrysik MA, Pang L, Hayes CP, Yoo DG, Park JJ, et al. Pyocyanin-enhanced neutrophil extracellular trap formation requires the NADPH oxidase. PLoS One. 2013;8(1):e54205. DOI: 10.1371/journal.pone.0054205.
17. Kirienko NV, Ausubel FM, Ruvkun G. Mitophagy confers resistance to siderophore-mediated killing by *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Feb 10;112(6):1821-6. DOI: 10.1073/pnas.1424954112
18. Palmer LD, Skaar EP. Transition metals and virulence in bacteria. Annu Rev Genet. 2016 Nov 23;50:67-91. DOI: 10.1146/annurev-genet-120215-035146
19. Brickman TJ, Armstrong SK. Temporal signaling and differential expression of *Bordetella* iron transport systems: the role of ferrimones and positive regulators. Biometals. 2009 Feb;22(1):33-41. DOI: 10.1007/s10534-008-9189-9
20. Sandy M, Butler A. Microbial iron acquisition: marine and terrestrial siderophores. Chem Rev. 2009 Oct;109(10):4580-95. DOI: 10.1021/cr9002787
21. Sia AK, Allred BE, Raymond KN. Siderocalins: siderophore binding proteins evolved for primary pathogen host defense. Curr Opin Chem Biol. 2013 Apr;17(2):150-7. DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.11.014
22. Perry RD, Fetherston JD. Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. Microbes Infect. 2011 Sep;13(10):808-17. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.04.008
23. Paauw A, Leverstein-van Hall MA, van Kessel KP, Verhoef J, Fluit AC.. Yersiniabactin reduces the respiratory oxidative stress response of innate immune cells. PLoS One. 2009 Dec 29;4(12):e8240. DOI: 10.1371/journal.pone.0008240.
24. Bobrov AG, Kirillina O, Fetherston JD, Miller MC, Burlison JA, Perry RD. The *Yersinia pestis* siderophore, yersiniabactin, and the ZnuABC system both contribute to zinc acquisition and the development of lethal septicaemic plague in mice. Mol Microbiol. 2014 Aug;93(4):759-75. DOI: 10.1111/mmi.12693.
25. Chaturvedi KS, Hung CS, Giblin DE, Urushidani S, Austin AM, Dinauer MC, Henderson JP. Cupric yersiniabactin is a virulence-associated superoxide dismutase mimic. ACS Chem Biol. 2014 Feb 21;9(2):551-61. DOI: 10.1021/cb400658k
26. Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal Biochem. 1987 Jan;160(1):47-56.
27. Forman S, Paulley JT, Fetherston JD, Cheng YQ, Perry RD. *Yersinia* ironomics: comparison of iron transporters among *Yersinia pestis* biotypes and its nearest neighbor, *Yersinia pseudotuberculosis*. Biometals. 2010 Apr;23(2):275-94. DOI: 10.1007/s10534-009-9286-4.

28. Rakin A, Schneider L, Podladchikova O. Hunger for iron: the alternative siderophore iron scavenging systems in highly virulent *Yersinia*. Front Cell Infect Microbiol. 2012 Nov 30;2:151. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00151
29. Podladchikova O, Rykova V, Antonenka U, Rakin A. *Yersinia pestis* autoagglutination is mediated by Hcp-like protein and siderophore yersiniachelin (Ych). Adv Exp Med Biol. 2012;954:289-92. DOI: 10.1007/978-1-4614-3561-7_36
30. Payne SM. Detection, isolation, and characterization of siderophores. Methods Enzymol. 1994;235:329-44.
31. Pierre J.L., Fontecave M. Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry. Biometals. 1999 Sep;12(3):195-9.
32. Peralta DR, Adler C, Corbalán NS, PazGarcía EC, Pomares MF, Vincent PA Enterobactin as part of the oxidative stress response repertoire. PLoS One. 2016 Jun 16;11(6):e0157799. DOI: 10.1371/journal.pone.0157799
33. Eisendle M, Schrettl M, Kragl C, Müller D, Illmer P, Haas H. The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage, oxidative-stress resistance, germination, and sexual development in *Aspergillus nidulans*. Eukaryot Cell. 2006 Oct;5(10):1596-603. DOI: 10.1128/EC.00057-06
34. Končić MZ, Barbarić M, Perković I, Zorc B. Antiradical, chelating and antioxidant activities of hydroxamic acids and hydroxyureas. Molecules. 2011 Jul 25;16(8): 6232-42. DOI: 10.3390/molecules16086232.

Информация о соавторе:

Подладчикова Ольга Николаевна, старший научный сотрудник,
ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора,
Ростов-на-Дону, Российская Федерация
Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-2703
E-mail: olgapod54@mail.ru

Information about co-author:

Olga N. Podladchikova, senior researcher, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute
Address: 117/40 M. Gorkogo str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: (863) 240-2703
E-mail: olgapod54@mail.ru

МЕЖДУНАРОДНАЯ МЕДИЦИНСКАЯ ПЕЧАТЬ

Бактериальная терапия экземы?

Согласно первоначальным данным, полученным в ходе предварительных клинических испытаний на национальном уровне Институтом здоровья, местное лечение живой культурой *Roseomonas mucosa* – бактерией, естественно присутствующей на коже, было безопасно для взрослых и детей с атопическим дерматитом (экземой) и ослабляло тяжесть заболевания. Доклиническая работа на мышиной модели атопического дерматита показала, что штаммы *R. mucosa*, собранные с поверхности здоровой кожи, могут облегчить симптомы заболевания.

Myles IA, Earland NJ, Anderson ED, Moore IN, Kieh MD, Williams KW, et al.
First-in-human topical microbiome transplantation with Roseomonas mucosa for atopic dermatitis.
JCI Insight. 2018;3(9). pii: 120608. doi: 10.1172/jci.insight.120608

Личинки мясных мух помогли найти новое средство против инфекций

Российские ученые нашли способ улучшить действие антибиотиков на биопленки, образованные бактериями, которые становятся причиной до 80% всех инфекционных заболеваний. Это удалось с помощью белкового соединения, полученного из личинок мух. Разработка поможет более эффективно бороться с микробными инфекциями. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (РНФ).

Chernysh S, Gordya N, Tulin D, Yakovlev A.
Biofilm infections between Scylla and Charybdis: interplay of host antimicrobial peptides and antibiotics. Infect Drug Resist. 2018 Apr 9;11:501-514. doi: 10.2147/IDR.S157847

Медики предложили способ остановить устойчивый к антибиотикам туберкулез

Российские ученые в сотрудничестве с американскими коллегами создали алгоритм для наиболее быстрого и эффективного выявления случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью.

Использование стратегии FAST в 2 российских больницах привело к значительному уменьшению количества случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью через 12 месяцев после ее внедрения.

Miller AC, Livchits V, Ahmad Khan F, Atwood S, Kornienko S, Kononenko Y, et al.
Turning off the tap: Using the FAST approach to stop the spread of drug-resistant tuberculosis in the Russian Federation.
J Infect Dis. 2018 Apr 5. doi: 10.1093/infdis/jiy190.

DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-45-49

Бактериология, 2018, том 3, №1, с. 45–49
Bacteriology, 2018, volume 3, No 1, p. 45–49

Эпидемиология, свойства и лабораторная диагностика энтеротоксигенных *Escherichia coli*

Н.Н.Карцев, Н.К.Фурсова

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

Энтеротоксигенные *Escherichia coli* (ETEC) являются одной из важных причин детской диареи, особенно в развивающихся странах, и диареи «путешественников». Патогенные свойства ETEC связаны с их способностью продуцировать термостабильный (ST) и/или термолабильный (LT) энтеротоксины, а также нести факторы адгезии, способствующие прикреплению бактерий к клеткам кишечника и его колонизации. Энтеротоксигенные штаммы *E. coli* являются не только одним из ведущих возбудителей диарей у детей в развивающихся странах, но также причиной спорадических случаев и вспышек пищевых инфекций у взрослого населения развитых стран. В последние десятилетия в мире отмечается тенденция к изменению соотношения энтеротоксинов у данной группы патогенных эшерихий: уменьшение доли штаммов, продуцирующих ST-энтеротоксин, и увеличение доли штаммов, продуцирующих LT-энтеротоксин.
Ключевые слова: энтеротоксигенные E. coli, дегидратационная диарея, термостабильный и термолабильный энтеротоксины

Для цитирования: Карцев Н.Н., Фурсова Н.К. Эпидемиология, свойства и лабораторная диагностика энтеротоксигенных *Escherichia coli*. Бактериология. 2018; 3(1): 45–49. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-45-49

Epidemiology, properties and laboratory diagnostics of enterotoxigenic *Escherichia coli*

N.N.Kartsev, N.K.Fursova

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

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is one of the important causes of childhood diarrhea, especially in developing countries, and diarrhea of «travelers». The pathogenic properties of ETECs are related to their ability to produce heat-stable (ST) and/or thermolabile (LT) enterotoxins, as well as to carry adhesion factors that promote bacteria attachment to colon cells and colonization. Enterotoxigenic *E. coli* strains are not only one of the leading pathogens of diarrhea in children in developing countries, but also a sporadic and foodborne outbreak in adults in developed countries. In recent decades, there has been a tendency in the world to change the ratio of enterotoxins in this group of pathogenic *Escherichia*: a decrease in the proportion of strains producing thermostable enterotoxin and an increase in the proportion of strains producing thermolabile enterotoxin.
Keywords: Enterotoxigenic E. coli, dehydration diarrhea, thermostable and thermolabile enterotoxins

For citation: Kartsev N.N., Fursova N.K. Epidemiology, properties and laboratory diagnostics of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Bacteriology. 2018; 3(1): 45–49. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-45-49

Эпидемиология ETEC-инфекции

Энтеротоксигенные *E. coli* – кишечные патогены, способные вызвать холероподобную диарею у человека и животных. Среди всех патогенных кишечных палочек ETEC являются наиболее распространенными и зачастую недооцененными возбудителями диареи человека в разных странах мира: в год регистрируется более 650 млн случаев ETEC-инфекций, среди которых 800 тыс. случаев заканчиваются смертью [1]. Каждый год в период с 2009 по 2012 гг. почти 700 000 детей младше пяти лет умирали от тяжелой дегидратационной диареи, в основном в развивающихся странах [2, 3]. Среди многих причин диарейных заболеваний энтеротоксигенная кишечная палочка и шигеллы являются двумя наиболее важными бактериальными патогенами [4]. ETEC

Для корреспонденции:

Карцев Николай Николаевич, 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) 36-0079
E-mail: kartsev@obolensk.org

Статья поступила 25.01.2018 г., принята к печати 30.03.2018 г.

For correspondence:

Nikolay N. Kartsev, researcher of antimicrobial agents lab., molecular microbiology department, 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) 36-0079
E-mail: kartsev@obolensk.org

The article was received 25.01.2018, accepted for publication 30.03.2018

также являются причиной диареи взрослых путешественников, прибывающих из развитых стран в развивающиеся, в том числе кишечных заболеваний в воинских контингентах сил Организации Объединенных Наций. Частота заболеваемости диареей среди путешественников, приезжающих в тропические и субтропические регионы, варьирует от 10 до 60%. Большой процент заболеваемости регистрируется в Латинской Америке, Африке и Индийском субконтиненте [5]. Установлена сезонность в заболеваемости ETEC-ассоциированной диареей: уровень заболеваемости возрастает на 7% на каждый градус повышения температуры окружающей среды, что связывают с ростом и распространением бактерий, контаминирующих пищевые продукты и воду [6].

На протяжении последних десятилетий эпидемиологического надзора за кишечными заболеваниями в мире отмечается изменение относительного вклада штаммов-продуцентов термостабильного (ST) и термолабильного (LT) энтеротоксинов в этиологию ETEC-инфекций. До последнего десятилетия большинство вспышек ETEC были вызваны преимущественно штаммами-продуцентами ST. Затем наступил период, когда доли ST- и LT-продуцирующих штаммов приблизительно сравнялись (30–35%) [6]. Однако в последние годы повсеместно отмечается преимущественное распространение LT-продуцирующих ETEC. Данный показатель различается в разных регионах мира и в популяциях населения: LT-продуцирующие штаммы в странах Латинской Америки и Карибского бассейна преобладают в популяциях путешественников (38%), а в странах Восточной Азии и Тихоокеанского региона – в популяциях непутешествующих людей (30%) [7].

Штаммы ETEC, выделяемые от людей во всем мире, наиболее часто (60–70% штаммов) принадлежат к серогруппам O6, O8, O25, O78, O128 и O153. Остальные 30–40% охарактеризованных штаммов ETEC принадлежали к большому числу других серогрупп [8]. В Российской Федерации описано выделение ETEC, принадлежащих к серогруппе O148 [9], а также к серогруппам O75, O25, O6, O20, O15 и O115 [10].

Факторы патогенности ETEC

Основными факторами патогенности ETEC являются ST- и LT-энтеротоксины, вызывающие нарушение электролитного баланса в клетках кишечного эпителия инфицированного макроорганизма, приводящее к острой профузной диарее.

Термолабильный энтеротоксин по структурным и антигенным характеристикам подобен холерному токсину (CT) и имеет аналогичный механизм действия [7]. LT – мультимерный белок с молекулярной массой 85,5 кДа, состоящий из одной ферментативной субъединицы L_A (28 кДа) и пентамера идентичных субъединиц L_B (11,5 кДа), ответственного за соединение с мишенью. Субъединицы L_A и L_B состоят из 240 и 130 аминокислот соответственно, из которых 18 и 21 аминокислот являются сигнальными последовательностями [11]. Пентамер неразрывно связывается с ганглиозидом GM1 на поверхности энтероцитов, что позволяет компоненту L_A активировать аденилатциклазу, расположенную на базолатеральной мембране поляризованных эпителиальных клеток кишечника. Это, в свою очередь, приводит к увеличению внутриклеточного уровня циклического аденозин монофосфата (цАМФ), который стимулирует активную секрецию анионов хлора на поверхность клеток и ингибирует абсорбцию хлорида натрия на кончиках ворсинок, что является причиной обильной диареи секреторного типа [7]. Стимуляция активной секреции анионов Cl^- как результат повышения уровня цАМФ является классическим объяснением патогенетического действия LT- и CT-энтеротоксинов. Показано, что данные токсины вызывают воспалительную реакцию в кишечнике, поскольку стимулируют продукцию провоспалительного цитокина – интерлейкина (IL 6) клетками кишечного эпителия [7].

Различают две разновидности LT-токсина: LT1 – продуцируемый штаммами, выделяемыми от человека, и LT2 – схожий с ним по строению и биологическим свойствам энтеротоксин, обнаруживаемый только у штаммов *E. coli*, выделенных от животных [12]. Установлено, что на секрецию LT-токсина штаммами ETEC влияет pH среды. В кислой среде секреция токсина через внешнюю мембрану клетки подавляется, а в нейтральных и щелочных условиях – значительно увеличивается [13]. По-видимому, ETEC используют градиент pH, имеющий место в пищеварительном тракте, для регуляции продукции термолабильного токсина. В кислотной среде желудка наблюдается накопление LT в периплазматическом пространстве клетки, токсин начинает экскретироваться из периплазмы только тогда, когда бактерии попадают в щелочную среду тонкого кишечника и прикрепляются к эпителию [14].

Большинство генов *elt*, кодирующих LT1, расположены на больших конъюгативных или мобилизируемых плазмидах, хотя описаны случаи, когда гены токсина LT1 расположены на хромосоме или профаге. Гены, кодирующие токсины LT2a и LT2b, расположены на хромосоме [11, 15]. В некоторых работах было показано, что *elt* гены фланкированы консервативными регионами, окруженными высоковариабельными последовательностями, являющимися частью IS-элементов, которые вовлечены в распространение *elt* оперонов среди плазмид [16].

Термостабильный энтеротоксин ST – низкомолекулярный мономерный белок, который вызывает в эукариотических клетках нарушение транспорта ионов железа, потерю электролитов и уменьшение абсорбции натрия с последующим выходом большого количества жидкости в просвет кишечника. Подобно термолабильному токсину, термостабильный токсин подразделяют на два класса: STa (ST1) и STb (ST2). В свою очередь, STa включает STp (свиной ST, ST1a) и STh (человеческий ST, ST1b) токсины, схожие по своей структуре и механизму действия. STa представлен небольшим пептидом, состоящим из 18–19 аминокислот (2 кДа). Рецептором для него является клеточная гуанилатциклаза типа C. Ее активация повышает уровень циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) в эпителиальных клетках, что, в свою очередь, приводит к потере электролитов и нарушению абсорбции хлорида натрия, тем самым вызывая обильную секрецию жидкости в просвет кишечника [17]. STb является пептидом, состоящим из 48 аминокислот, имеющим молекулярную массу 5,1 кДа и относящимся к группе мембрано-повреждающих токсинов. Рецептор для STb в настоящее время не определен, но, в отличие от STa, данный токсин не влияет на уровень цГМФ, но стимулирует секрецию эпителиальны-

ми клетками кишечника бикарбонатов, простагландина E2 и серотонина [7]. Термостабильный энтеротоксин STa кодируется транспозон-ассоциированным *estA* геном, локализованным на плазмидах. Энтеротоксин STb кодируется геном *estB*, также расположенным на плазмидах [17].

Факторы адгезии и колонизации ETEC

Наиболее значимым вирулентным фактором штаммов ETEC является их способность к адгезии. Адгезия ETEC на эпителиальных клетках тонкого кишечника с последующей его колонизацией осуществляется за счет активности комплекса пилиарных и фимбриальных факторов группы CFA (антиген колонизации) и CS (поверхностный антиген *E coli*). Более 90% штаммов ETEC, выделенных во всем в мире с 1980-х гг., имели факторы адгезии и колонизации CF. К настоящему времени описано более 25 CF, различающихся по первичным аминокислотным последовательностям структурных субъединиц фимбрий. Наиболее охарактеризованными колонизационными факторами у ETEC являются CFA/I, CFA/II и CFA/IV, в состав которых входят поверхностные антигены CS1–CS6 [5]. Наиболее распространенными среди детектируемых факторов адгезии и колонизации являются CFA/I и (CS1-CS6), затем следуют CS7, CS14 и CS17 [18, 19]. Несмотря на важную роль CFs в патогенезе ETEC, в настоящее время они обнаруживаются только у 50–70% изолятов, выделенных в мире [20]. Показано, что гены факторов колонизации ETEC могут быть локализованы как в хромосоме, так и на плазмидах, в составе полицистронного оперона, кодирующего субъединицы фимбрий, шапероны и белки-ушеры [21]. Сообщается, что штаммы ETEC, экспрессирующие антигены адгезии CFA/I, CS1, CS2 или CS3, способны более эффективно образовывать биопленки из-за высокой гидрофобности данных структур, по сравнению с изогенными штаммами, продуцирующими другие классы антигенов адгезии [22].

Антибиотикорезистентность среди ETEC: распространение и молекулярные механизмы

Для лечения кишечных патогенов, как правило, используют цефалоспорины III поколения и фторхинолоны. Развитие резистентности энтеробактерий к современным антибиотикам за счет наличия у них бета-лактамаз расширенного спектра действия (БЛРС) вызывает большую обеспокоенность во многих странах. В течение последнего десятилетия БЛРС CTX-M-типа быстро распространились среди диареегенных штаммов *E. coli* и в настоящее время доминирующие гены *CTX-M-15* и *CTX-M-14* детектируются у эшерихий по всему миру [23]. Исследователи из многих стран мира детектируют в геномах энтеротоксигенных штаммов *E. coli* гены $bla_{CTX\text{-}M}$ различных аллелей. К примеру, исследование, проведенное в Республике Корея, показало наличие семи штаммов ETEC – продуцентов БЛРС *CTX-M-12, CTX-M-14* и *CTX-M-15*, что составило менее 3,2% от общего числа изученных диареегенных эшерихий, отобранных в период с 2008 по 2011 гг. [24, 25].

Лабораторная диагностика энтеротоксигенных *E. coli*

Лабораторная диагностика ETEC основана на подтверждении продукции культурой *E. coli* LT-и/или ST-токсинов. В качестве золотых стандартов для идентификации этих энтеротоксинов первоначально использовали биологические пробы на кроликах и мышах. Эти методы достаточно трудозатратны, требуют много времени и высокой квалификации при их выполнении [18]. В 1974 г. было обнаружено, что действие LT-энтеротоксина вызывает морфологические изменения на клеточных линиях Y1-надпочечника и яичника китайского хомячка, которые нейтрализуются введением антитоксина [26, 27]. Данные методики были применимы только для обнаружения LT-энтеротоксина и были малодоступны для большинства диагностических лабораторий, что затрудняло диагностику ETEC для врачей-клиницистов. Вскоре после этого для подтверждения продукции LT были разработаны фермент-связанный иммуносорбентный анализ, пассивная латекс-агглютинация, иммунопреципитация в агаре, которые оказались достаточно чувствительными и специфичными [28–30]. Развитие ПЦР произвело революцию в клинической диагностике патогенных микроорганизмов, данная методика впервые была использована для выявления штаммов ETEC в 1994 г. [31].

Помимо определения энтеротоксинов, для идентификации и характеристики штаммов ETEC применялось и серотипирование с помощью О-специфических агглютинирующих сывороток. Однако, как показано в исследованиях, проведенных в разных странах, клинические изоляты ETEC могут принадлежать к большому числу серотипов, что делает этот метод непригодным для определения патогруппы этих бактерий [32].

В настоящее время для лабораторной диагностики энтеротоксигенной инфекции в нашей стране применяются мультиплексные ПЦР тест-системы с гибридизационно-флюоресцентной детекцией «АмплиСенс® Эшерихиозы-FL» (Интерлабсервис, Россия) [33]. Однако методов генодиагностики не всегда бывает достаточно для получения полной характеристики штаммов. Для фенотипического подтверждения продукции энтеротоксинов штаммами ETEC существуют латексные диагностикумы Oxoid VET-RPLA Toxin Detection Kit производства фирмы OXOID (Англия) для идентификации термолабильного и холерного энтеротоксинов в реакции пассивной латекс-агглютинации.

К сожалению, несмотря на наличие различных методов, до сих пор нет простых, доступных методов идентификации этих микроорганизмов в минимально оборудованных лабораториях. Таким образом, ETEC не входит в стандартную диагностику диареи во многих лабораториях.

Литература

1. Johnson TJ, Nolan LK. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev. 2009 Dec;73(4):750-74. DOI: 10.1128/MMBR.00015-09
2. Gonzales L, Sjöling Å. The different ecological niches of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Environ Microbiol. 2016 Mar;18(3):741-51. DOI: 10.1111/1462-2920.13106
3. United Nations Children's Fund. Committing to child survival: promise renewed progress report 2013. UNICEF; 2013. Available: http://www.unicef.org/lac/Committing_to_Child_Survival_APR_9_Sept_2013.pdf
4. Walker RI. An assessment of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Shigella* vaccine candidates for infants and children. Vaccine. 2015 Feb 18;33(8):954-65. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.11.049

5. DuPont HL. Systematic review: the epidemiology and clinical features of travellers' diarrhea. Aliment Pharmacol Ther. 2009 Aug;30(3):187-96. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2009.04028.x.
6. Paredes-Paredes M, Okhuysen PC, Flores J, Mohamed JA, Padda RS, Gonzalez-Estrada A, et al. Seasonality of Diarrheagenic Escherichia coli pathotypes in U.S. Students Acquiring Diarrhea in Mexico. J Travel Med. 2011 Mar-Apr;18(2):121-5. DOI: 10.1111/j.1708-8305.2010.00488.x
7. Jiang Z-D, Butzler J-P. The bacterial pathogens. In: Travelers' diarrhea. 2nd ed. BC Decker Inc.; 2008. pp. 6-17.
8. Wolf MK. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1997 Oct;10(4):569-84.
9. Егорова СА, Макарова МА, Кафтырева ЛА. Этиологическая значимость условно-патогенных энтеробактерий при острых кишечных заболеваниях и дисбиотических состояниях кишечника. Инфекция и иммунитет. 2011; 1(2):181-4.
10. Гончар НВ, Партина ИВ, Ныркова ОИ, Драп АС. Антибиотико- и фагорезистентность клинических штаммов кишечной палочки у госпитализированных детей Санкт-Петербурга, больных эшерихиозами. Антибиотики и химиотерапия. 2014;59(9/10):38-43.
11. Imamura S, Kido N, Kato M, Kawase H, Miyama A, Tsuji T. A unique DNA sequence of human enterotoxigenic *Escherichia coli* enterotoxin encoded by chromosomal DNA. FEMS Microbiol Lett. 1997 Jan 15;146(2):241-5.
12. Smith HW, Halls S. Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on Escherichia coli infections in pigs, calves, lambs and rabbits. J Pathol Bacteriol. 1967 Apr;93(2):499-529. DOI: 10.1002/path.1700930211
13. Gonzales L, Ali ZB, Nygren E, Wang Z, Karlsson S, Zhu B, et al. Alkaline pH Is a signal for optimal production and secretion of the heat labile toxin, LT in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). PLoS One. 2013 Sep 18;8(9):e74069. DOI: 10.1371/journal.pone.0074069.
14. Gonzales L, Sjöling Å. The different ecological niches of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Environ Microbiol. 2016 Mar;18(3):741-51. DOI: 10.1111/1462-2920.13106.
15. Jobling MG, Holmes RK. Type II heat-labile enterotoxins from 50 diverse *Escherichia coli* isolates belong almost exclusively to the LT-IIc family and may be prophage encoded. PLoS One. 2012;7(1):e29898. DOI: 10.1371/journal.pone.0029898
16. Jobling MG, Holmes RK. Heat-Labile Enterotoxins. EcoSal Plus. 2006 Jan;2(1). DOI: 10.1128/ecosalplus.8.7.5
17. Sears CL, Kaper JB. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. Microbiol Rev. 1996 Mar;60(1):167-215.
18. Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment and prevention. Clin Microbiol Rev. 2005 Jul;18(3):465-83. DOI: 10.1128/CMR.18.3.465-483.2005
19. von Mentzer A, Connor TR, Wieler LH, Semmler T, Iguchi A, Thomson NR, et al. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. Nat Genet. 2014 Dec;46(12):1321-6. DOI: 10.1038/ng.3145
20. Shahrokhi N, Bouzari S, Jafari A. Comparison of virulence markers and antibiotic resistance in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated ten years apart in Tehran. J Infect Dev Ctries. 2011 Apr 26;5(4):248-54.
21. Turner SM, Scott-Tucker A, Cooper LM, Henderson IR. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. 2006 Oct;263(1):10-20. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00401.x
22. Liaqat I, Sakellaris H. Biofilm formation and binding specificities of CFA/I, CFA/II and CS2 adhesions of enterotoxigenic *Escherichia coli* and Cfae-R181A mutant. Braz J Microbiol. 2012 Jul;43(3):969-80. DOI: 10.1590/S1517-83822012000 3000018
23. Canton R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. Front Microbiol. 2012 Apr 2;3:110. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00110
24. Kim JS, Kim J, Kim SJ, Jeon SE, Oh KH, Cho SH, et al. Characterization of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase-producing diarrheagenic *Escherichia coli* isolates in the Republic of Korea during 2008-2011. J Microbiol Biotechnol. 2014 Mar 28;24(3):421-6.
25. Koczura R, Mokracka J, Barczak A, Krysiak N, Kaznowski A. Association between the presence of class 1 integrons, virulence genes, and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolates from river water. Microb Ecol. 2013 Jan;65(1):84-90. DOI: 10.1007/s00248-012-0101-3
26. Donta SE, Smith DM. Stimulation of steriodogenesis in tissue culture by enterotoxigenic *Escherichia coli* and its neutralization by specific antiserum. Infect Immun. 1974 Mar;9(3):500-5.
27. Guerrant RL, Brunton LL, Schnaitman TC, Rebhun LI, Gilman AG. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cells morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of Vibrio cholerae and *Escherichia coli*. Infect Immun. 1974 Aug;10(2):320-7.
28. Honda T, Akhtar Q, Glass RI, Kibriya AK. A simple assay to detect *Escherichia coli* producing heat labile enterotoxin: results of a field study of the Biken tests in Bangladesh. Lancet. 1981 Sep 19;2(8247):609-10.
29. Scotland SM, Floman RH, Rowe B. Evaluation of a reversed passive latex agglutination test for detection of *Escherichia coli* heat-labile toxin in culture supernatants. J Clin Microbiol. 1989 Feb;27(2):339-40.
30. Yolken, R.H. Enzyme-linked immunosorbant assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. J Clin Microbiol. 1977 Nov;6(5):439-44.
31. Schultsz C, Pool GJ, van Ketel R, de Wever B, Speelman P, Dankert J. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. J Clin Microbiol. 1994 Oct; 32(10):2393-7.
32. Ahren CM, Svennerholm AM. Synergistic protective effect of antibodies against *Escherichia coli* enterotoxin and colonization factor antigens. Infect Immun. 1982 Oct;38(1):74-9.
33. Горелов АВ, Бондарева АВ. Стартовая терапия эшерихиозов у детей. Лечение и профилактика. 2016;4(20):69-73.

References

1. Johnson TJ, Nolan LK. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev. 2009 Dec;73(4):750-74. DOI: 10.1128/MMBR.00015-09
2. Gonzales L, Sjöling Å. The different ecological niches of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Environ Microbiol. 2016 Mar;18(3):741-51. DOI: 10.1111/1462-2920.13106
3. United Nations Children's Fund. Committing to child survival: promise renewed progress report 2013. UNICEF; 2013. Available: http://www.unicef.org/lac/Committing_to_Child_Survival_APR_9_Sept_2013.pdf
4. Walker RI. An assessment of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Shigella* vaccine candidates for infants and children. Vaccine. 2015 Feb 18;33(8):954-65. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.11.049
5. DuPont HL. Systematic review: the epidemiology and clinical features of travellers' diarrhea. Aliment Pharmacol Ther. 2009 Aug;30(3):187-96. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2009.04028.x.
6. Paredes-Paredes M, Okhuysen PC, Flores J, Mohamed JA, Padda RS, Gonzalez-Estrada A, et al. Seasonality of Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes in U.S. Students Acquiring Diarrhea in Mexico. J Travel Med. 2011 Mar-Apr;18(2):121-5. DOI: 10.1111/j.1708-8305.2010.00488.x
7. Jiang Z-D, Butzler J-P. The bacterial pathogens. In: Travelers' diarrhea. 2nd ed. BC Decker Inc.; 2008. pp. 6-17.
8. Wolf MK. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1997 Oct;10(4):569-84.

9. Egorova SA, Makarova MA, Kaftyreva LA. Opportunictic enterobacteriacae as the cause of the acute diarrhea and gut disbiosis. Russian Journal of Infection and Immunity. 2011;1(2):181-4. (In Russian).
10. Gonchar NV, Partina IV, Nyrkova OI, Drap AC. Resistance of Clinical Strains of Pathogenic E.coli to Antibiotics and Bacteriophage in Hospitalized Children with Escherichiosis in St.Petersburg. Antibiotics and Chemotherapy. 2014;59(9/10): 38-43. (In Russian).
11. Imamura S, Kido N, Kato M, Kawase H, Miyama A, Tsuji T. A unique DNA sequence of human enterotoxigenic *Escherichia coli* enterotoxin encoded by chromosomal DNA. FEMS Microbiol Lett. 1997 Jan 15;146(2):241-5.
12. Smith HW, Halls S. Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. J Pathol Bacteriol. 1967 Apr;93(2):499-529. DOI: 10.1002/path.1700930211
13. Gonzales L, Ali ZB, Nygren E, Wang Z, Karlsson S, Zhu B, et al. Alkaline pH Is a signal for optimal production and secretion of the heat labile toxin, LT in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). PLoS One. 2013 Sep 18;8(9):e74069. DOI: 10.1371/journal.pone.0074069.
14. Gonzales L, Sjöling Å. The different ecological niches of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Environ Microbiol. 2016 Mar;18(3):741-51. DOI: 10.1111/1462-2920.13106.
15. Jobling MG, Holmes RK. Type II heat-labile enterotoxins from 50 diverse *Escherichia coli* isolates belong almost exclusively to the LT-IIc family and may be prophage encoded. PLoS One. 2012;7(1):e29898. DOI: 10.1371/journal.pone.0029898
16. Jobling MG, Holmes RK. Heat-Labile Enterotoxins. EcoSal Plus. 2006 Jan;2(1). DOI: 10.1128/ecosalplus.8.7.5
17. Sears CL, Kaper JB. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. Microbiol Rev. 1996 Mar;60(1):167-215.
18. Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment and prevention. Clin Microbiol Rev. 2005 Jul;18(3):465-83. DOI: 10.1128/CMR.18.3.465-483.2005
19. von Mentzer A, Connor TR, Wieler LH, Semmler T, Iguchi A, Thomson NR, et al. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. Nat Genet. 2014 Dec;46(12):1321-6. DOI: 10.1038/ng.3145
20. Shahrokhi N, Bouzari S, Jafari A. Comparison of virulence markers and antibiotic resistance in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated ten years apart in Tehran. J Infect Dev Ctries. 2011 Apr 26;5(4):248-54.
21. Turner SM, Scott-Tucker A, Cooper LM, Henderson IR. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. 2006 Oct;263(1):10-20. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00401.x
22. Liaqat I, Sakellaris H. Biofilm formation and binding specificities of CFA/I, CFA/II and CS2 adhesions of enterotoxigenic *Escherichia coli* and Cfae-R181A mutant. Braz J Microbiol. 2012 Jul;43(3):969-80. DOI: 10.1590/S1517-838220120003000018
23. Canton R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. Front Microbiol. 2012 Apr 2;3:110. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00110
24. Kim JS, Kim J, Kim SJ, Jeon SE, Oh KH, Cho SH, et al. Characterization of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase-producing diarrheagenic *Escherichia coli* isolates in the Republic of Korea during 2008-2011. J Microbiol Biotechnol. 2014 Mar 28;24(3):421-6.
25. Koczura R, Mokracka J, Barczak A, Krysiak N, Kaznowski A. Association between the presence of class 1 integrons, virulence genes, and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolates from river water. Microb Ecol. 2013 Jan;65(1):84-90. DOI: 10.1007/s00248-012-0101-3
26. Donta SE, Smith DM. Stimulation of steriodogenesis in tissue culture by enterotoxigenic *Escherichia coli* and its neutralization by specific antiserum. Infect Immun. 1974 Mar;9(3):500-5.
27. Guerrant RL, Brunton LL, Schnaitman TC, Rebhun LI, Gilman AG. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cells morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of Vibrio cholerae and *Escherichia coli*. Infect Immun. 1974 Aug;10(2):320-7.
28. Honda T, Akhtar Q, Glass RI, Kibriya AK. A simple assay to detect *Escherichia coli* producing heat labile enterotoxin: results of a field study of the Biken tests in Bangladesh. Lancet. 1981 Sep 19;2(8247):609-10.
29. Scotland SM, Floman RH, Rowe B. Evaluation of a reversed passive latex agglutination test for detection of *Escherichia coli* heat-labile toxin in culture supernatants. J Clin Microbiol. 1989 Feb;27(2):339-40.
30. Yolken, R.H. Enzyme-linked immunosorbant assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. J Clin Microbiol. 1977 Nov;6(5):439-44.
31. Schultsz C, Pool GJ, van Ketel R, de Wever B, Speelman P, Dankert J. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. J Clin Microbiol. 1994 Oct;32(10):2393-7.
32. Ahren CM, Svennerholm AM. Synergistic protective effect of antibodies against *Escherichia coli* enterotoxin and colonization factor antigens. Infect Immun. 1982 Oct;38(1):74-9.
33. Gorelov AV, Bondareva AV. The starting therapy of colibacillosis in children. Disease Treatment and Prevention. 2016;4(20):69-73. (In Russian).

Информация о соавторе:

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) 36-0079
E-mail: fursova@obolensk.org

Information about co-author:

Nadezhda K. Fursova, PhD (Biol.), head of antimicrobial agents lab., molecular microbiology 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) 36-0079
E-mail: fursova@obolensk.org

Бактериология, 2018, том 3, №1, с. 50–54
Bacteriology, 2018, volume 3, No 1, p. 50–54

DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-50-54

Сравнение классических и экспресс-методов выявления бактерий при микробиологическом контроле говядины

В.В.Можаева, А.С.Смолькина

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Российская Федерация

В настоящее время для микробиологических исследований продуктов питания используются разнообразные методы выявления бактерий IV группы патогенности.
Цель данной работы – провести микробиологические исследования говядины классическими методами в сравнении с применением современных экспресс-анализаторов.
Выполнялся микробиологический контроль говядины на присутствие бактерий группы кишечной палочки, сальмонелл и листерий. В качестве экспресс-анализаторов использовали: для выявления бактерий группы кишечной палочки – экспресс-анализатор bioMerieux TEMPO TC (Франция), для выявления бактерий рода листерий – иммунофлуоресцентный экспресс-анализатор Mini Vidas (bioMerieux, Франция), а также экспресс-тест для идентификации вида листерий Api Listeria (bioMerieux, Франция) и для выявления бактерий рода сальмонелл использовали экспресс-анализатор RABIT (Don Whitley Scientific, United Kingdom), а также экспресс-тест для идентификации вида сальмонеллы RapiD 20E (bioMerieux, Франция).
В ходе микробиологических исследований 12 проб говядины классическими методами и с помощью современных экспресс-анализаторов в трех из них были обнаружены бактерии группы кишечной палочки, *Salmonella typhimurium* и *Listeria monocytogenes*.
Ключевые слова: бактерии группы кишечной палочки, листерия, сальмонелла, экспресс-анализатор, говядина

Для цитирования: Можаева В.В., Смолькина А.С. Сравнение классических и экспресс-методов выявления бактерий при микробиологическом контроле говядины. Бактериология. 2018; 3(1): 50–54. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-50-54

Comparison of the classic methods of bacterial detection and express analyzers during the microbiological control of beef

V.V.Mozhaeva, A.S.Smolkina

St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Currently for microbiological researches both classical, and modern methods of identification of bacteria of fourth group of pathogenicity are used.
The purpose of this work was to conduct microbiological researches of beef by classical methods in comparison with use of modern express analyzers. Microbiological control of beef for the presence of bacteria of E. coli group, Salmonella and Listeria was performed.
The following express-analyzers were used in the work: bioMerieux TEMPO TC (France) – for the identification of E.coli bacteria group; Mini Vidas and Api Listeria (bioMerieux, France) – for the identification of Listeria; RABIT (Don Whitley Scientific, United Kingdom) and RapiD 20E (bioMerieux, France) – for the identification of Salmonella.
Escherichia coli group bacteria, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* have been found both by classical, and by modern express methods in 3 of 12 probes of beef during microbiological research.
Keywords: colibacillus bacteria, listeria, salmonella, express analyzer, beef

For citation: Mozhaeva V.V., Smolkina A.S. Comparison of the classic methods of bacterial detection and express analyzers during the microbiological control of beef. Bacteriology. 2018; 3(1): 50–54. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-50-54

Для корреспонденции:

Смолькина Алина Сергеевна, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»

Адрес: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5
Телефон: (812) 388-3631
E-mail: alina.smolkina@bk.ru

Статья поступила 17.01.2018 г., принята к печати 30.03.2018 г.

For correspondence:

Alina S. Smolkina, candidate of veterinary sciences, associate professor of veterinary and sanitary examination, St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine

Address: 5 Chernigovskaya str., St. Petersburg 196084, Russian Federation
Phone: (812) 388-3631
E-mail: alina.smolkina@bk.ru

The article was received 17.01.2018, accepted for publication 30.03.2018

Говядина является одним из главных животноводческих продуктов питания для населения нашей планеты. Она обладает высокими вкусовыми и потребительскими качествами. Но в процессе убоя скота, первичной обработки, транспортировки туш, хранения и реализации мясо может обсеменяться микрофлорой, что приводит к его порче и наносит вред здоровью людей. Вместе с сапрофитной микрофлорой в мясо попадают патогенные и токсигенные микроорганизмы, которые способны вызывать инфекционные болезни и пищевые отравления. Поэтому мясо подвергается строгому ветеринарно-санитарному и санитарно-микробиологическому контролю со стороны ветеринарной службы [1].

В настоящее время для микробиологических исследований продуктов питания используются как классические, так и современные методы выявления бактерий IV группы патогенности. Классические методы требуют меньше денежных затрат, но более трудоемки. В среднем на выявление любого рода бактерий данной группы требуется 5–6 дней. В то же время при использовании современных экспресс-анализаторов эти исследования занимают не более двух суток.

Цель работы: провести микробиологические исследования говядины классическими методами в сравнении с применением современных экспресс-анализаторов.

Материалы и методы

Исследования проводились в ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» на кафедре ветеринарно-санитарной экспертизы, а также в ФГБУ «Ленинградская межобластная ветеринарная лаборатория» в лаборатории пищевой микробиологии и ветеринарно-санитарной экспертизы.

Объектом наших исследований послужили 12 проб говядины, в которых выявляли БГКП (бактерии группы кишечной палочки), бактерии родов *Listeria* и *Salmonella*.

В работе также использовали: экспресс-анализатор bioMerieux TEMPO TC (Франция) – для выявления БГКП; экспресс-анализатор Mini Vidas (bioMerieux, Франция) и экспресс-тест Api Listeria (bioMerieux, Франция) – для выявления бактерий рода *Listeria*; экспресс-анализатор RABIT (Don Whitley Scientific, United Kingdom) и экспресс-тест RapiD 20E (bioMerieux, Франция) – для выявления бактерий рода *Salmonella*.

Результаты и обсуждение

Определение бактерий группы кишечной палочки

Для выявления БГКП использовали жидкую питательную среду Кесслера, дифференциально-диагностическую среду Эндо, 3-сахарный агар Олькеницкого. Схема исследования и его отдельные этапы показаны на рис. 1–3 [2].

При использовании современного метода выявления БГКП с помощью экспресс-анализатора «bioMerieux TEMPO TC» применяли специальные питательные среды на базе традиционных, (прилагались к комплекту), а также карты TEMPO. Результат учитывали по флуоресцирующим меткам.

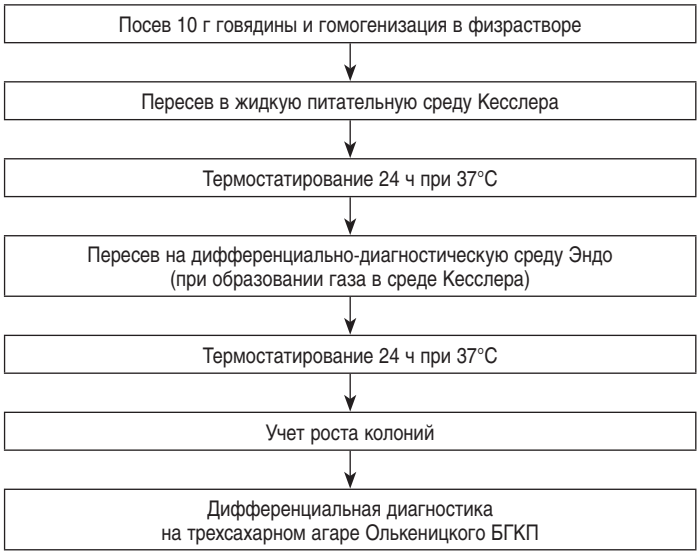


Рис. 1. **Схема выявления БГКП.**

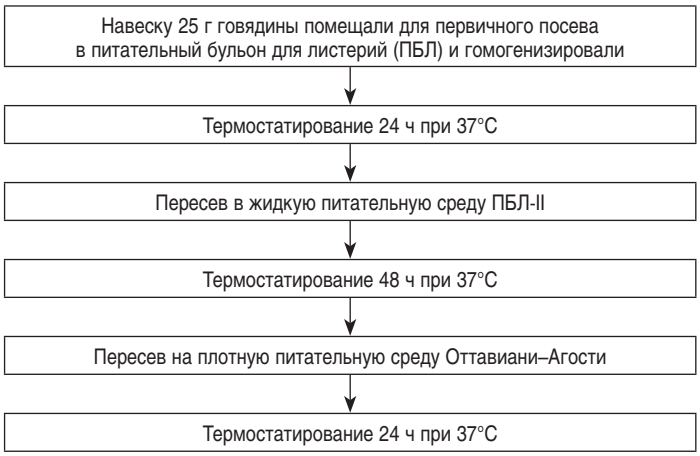


Рис. 4. **Схема выделения бактерий рода *Listeria*.**

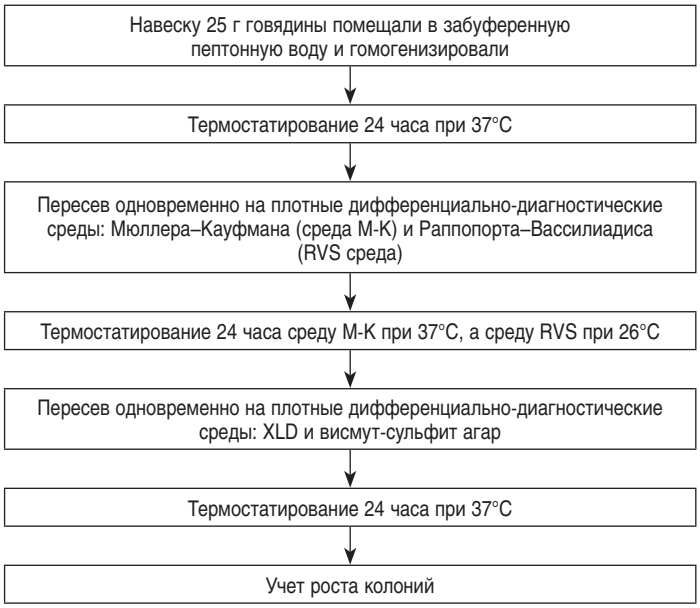


Рис. 8. **Схема выявления бактерий рода *Salmonella*.**

Определение бактерий рода *Listeria*

Для выделения бактерий рода *Listeria* использовали следующие среды: питательный бульон для листерий (ПБЛ), жидкую питательную среду ПБЛ–II, плотную питательную среду Оттавиани–Агости. Выделение данных бактерий проводили по схеме, изображенной на рис. 4 [3].

При росте колоний оливкового цвета с прозрачным ореолом, показанных на рис. 5, проводили биохимическое исследование при помощи экспресс-теста «bioMerieux Api listeria» (Франция), изображенного на рис. 6. Он позволяет за 4 ч идентифицировать листерий. Данный экспресс-тест состоит из лунок, которые содержат специфические тесты. В каждую ячейку вносили выросшую колонию, заливали парафиновым маслом и отправляли в термостат. Далее проводили идентификацию листерий при помощи таблицы, которая прилагалась к набору данного экспресс-теста.

Также в качестве экспресс-анализатора использовали анализатор фирмы bioMerieux иммунофлюоресцентный miniVidas (Франция) для выявления *Listeria monocytogenes*, который изображен на рис. 7. Для этого использовали стрипы, которые состоят из лунок и конусовидных пробирок. После все необходимые компоненты ставили в анализатор и наблюдали результаты на мониторе.

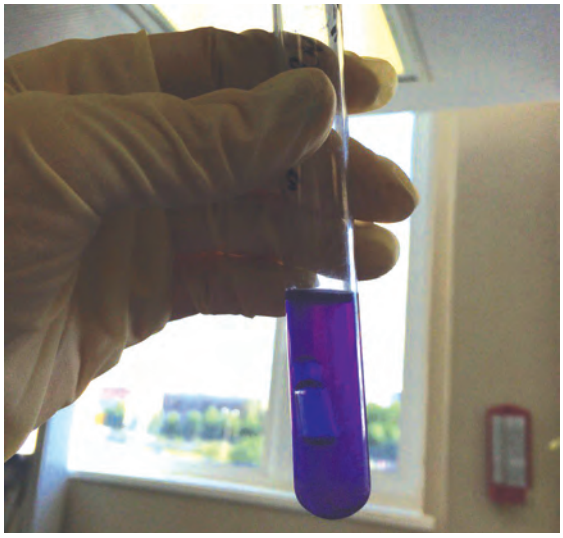


Рис. 2. **Учет газообразования на среде Кесслера.**

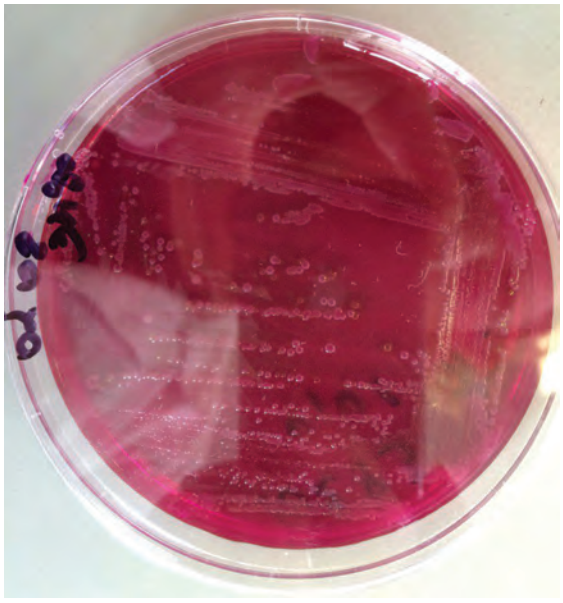


Рис. 3. **Учет роста колоний на среде Эндо.**

Определение бактерий рода *Salmonella*

Для выявления бактерий рода *Salmonella* использовали такие среды, как забуференная пептонная вода (ЗПВ), две жидкие питательные среды: среда Мюллера–Кауфмана и среда Раппопорта–Вассилиадиса, две плотные дифференциально-диагностические среды: среда XLD и среда висмульт–сульфит агар [4]. Схема исследования на данный показатель микробиологического контроля представлена на рис. 8.

При обнаружении колоний черного цвета, которые представлены на рис. 9, проводили биохимическое исследование при помощи экспресс-теста bioMerieux RapiD 20E (Франция),

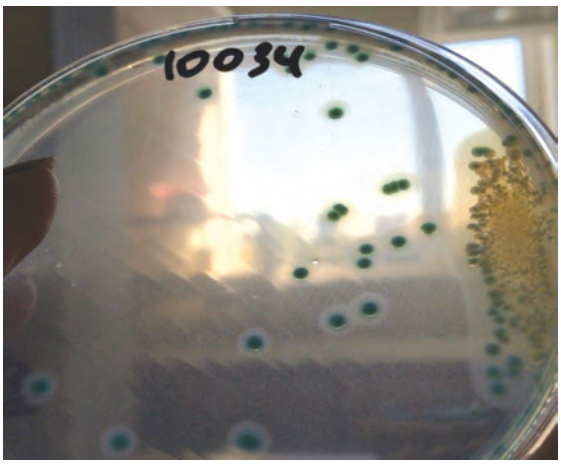


Рис. 5. **Рост колоний на хромогенном агаре Оттавиани–Агости.**

Рис. 6. **Экспресс-тест bioMerieux Api listeria (Франция).**

Рис. 7. **Экспресс-анализатор bioMerieux TEMPO TC (Франция) (слева), экспресс-анализатор bioMerieux miniVidas (Франция) (справа).**

Таблица. **Результаты микробиологического исследования говядины**

№ проб	Обнаружение БГКП	Обнаружение бактерий рода *Salmonella*	Обнаружение бактерий рода *Listeria*
1–4, 6–8, 10, 11	Не выявлено	Не выявлено	Не выявлено
5	Не выявлено	**Выявлено**	Не выявлено
9	Не выявлено	Не выявлено	**Выявлено**
12	**Выявлено**	Не выявлено	Не выявлено

представленного на рис. 10. Данный тест может проводиться для идентификации не только сальмонелл, но и других микроорганизмов. В каждую ячейку вносили колонию, заливали парафиновым маслом и отправляли в термостат на 4 ч при 37°С. По истечении времени проводили идентификацию бактерии с помощью таблицы, которая прилагалась к набору данного экспресс-теста.

Для экспресс-метода использовали анализатор компании Don Whitley Scientific RABIT (Rapid Automated Bacterial Impedance Technique) (Великобритания), изображенный на рис. 11. Для данного метода проводится подготовка проб: делали первичный посев в забуференную пептонную воду и отправляли в термостат на 24 ч при 37°С. Далее вносили образец в измерительную ячейку, добавляли питательную среду и ставили в инкубаторный модуль. В этом модуле уже имелись измерительные ячейки с контролями, стоящие в первом ряду. После чего на мониторе появлялся график, который шел в сравнении с первым рядом ячеек с уже известными бактериями.

Результаты микробиологических исследований 12 проб говядины представлены в таблице.

В ходе микробиологического исследования говядины в пробе №12 были выявлены БГКП, в пробе №9 – бактерии вида *Listeria monocytogenes*, в пробе №5 – бактерии вида *Salmonella typhimurium*.

Классический метод для выявления БГКП требует около 3 сут, а при помощи экспресс-анализатора bioMerieux TEMPO TC (Франция) требуется 24 ч для получения окончательного результата.

Для проведения классического метода на выявление бактерий рода *Listeria* требуется около 5 дней, а при использовании экспресс-анализатора bioMerieux miniVidas (Франция) – всего 2 сут.

Для выделения классическим методом бактерий рода *Salmonella* необходимо около 4 дней, а при экспресс-методе с помощью экспресс-анализатора Don Whitley Scientific RABIT (Rapid Automated Bacterial Impedance Technique) (Великобритания) – всего 48 ч.

Применение в работе современных экспресс-анализаторов имеет ряд преимуществ перед классическими методами:

- автоматизация аналитических этапов;
- просты и удобны в использовании;
- позволяют получать результаты быстрее на несколько суток;
- позволяют обеспечить быстрый выпуск продовольственного сырья.

Проведя всесторонний анализ исследований 12 проб говядины, были обнаружены микроорганизмы в трех пробах как при классических методах, так и с помощью современных экспресс-анализаторов.

Рис. 9. **Рост колоний на среде XLD.**

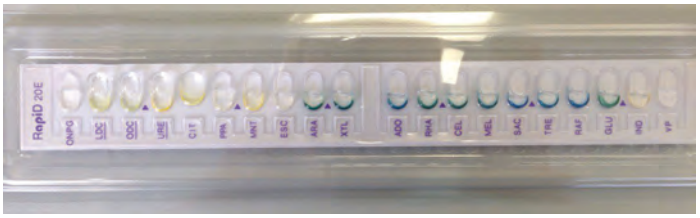


Рис. 10. **Экспресс-тест RapiD 20E (Франция).**

Рис. 11. **Экспресс-анализатор Don Whitley Scientific RABIT (Rapid Automated Bacterial Impedance Technique) (Великобритания).**

Литература

1. Можаева ВВ, Смолькина АС. Санитарно-микробиологический контроль говядины. Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны». СПб., 2017, с. 147-148.
2. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий): ГОСТ 31747-2012. Госстандарт России. Изд. офиц. М.: Стандартинформ, 2013, 15 с.
3. Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*: ГОСТ 32031-2012. Госстандарт России. Изд. офиц. М.: Стандартинформ, 2014, 25 с.
4. Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*: ГОСТ 31659-2012. Госстандарт России. Изд. офиц. М.: Стандартинформ, 2014, 19 с.

References

1. Mozhaeva VV Smolkina AS. The sanitary-microbiological control of beef. The International Scientific Conference materials of students, graduate students and junior scientists “The knowledge of Young Generation needed for veterinary medicine and agro-industrial complex development”. St. Petersburg, 2017, p. 147-148.
2. Food products. The detection methods of coliform bacteria. GOST: 31747-2012. Russian State Standard. Official publication. Moscow: Standardinform, 2013, 15 p.
3. Food products. The detection methods of *Listeria monocytogenes* bacteria. GOST: 32031-2012. Russian State Standard. Official publication. Moscow: Standardinform, 2015, 25 p.
4. Food products. The detection methods of *Salmonella* bacteria. GOST: 31659-2012. Russian State Standard. Official publication. Moscow: Standardinform, 2014, 19 p.

Информация о соавторе:

Можаева Виктория Витальевна, магистрант факультета ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»
Адрес: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5
Телефон: (812) 388-3631
E-mail: dolce-2015@yandex.ru

Information about co-author:

Victoria V. Mozhaeva, master student of faculty of veterinary and sanitary examination, St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine
Address: 5 Chernigovskaya str., St. Petersburg 196084, Russian Federation
Phone: (812) 388-3631
E-mail: dolce-2015@yandex.ru

МЕЖДУНАРОДНАЯ МЕДИЦИНСКАЯ ПЕЧАТЬ

Основное различие между людьми и другими млекопитающими – кожа

Команда исследователей из Университета Ватерлоо и Университета Гвельфа провела самый полный обзор млекопитающих на сегодняшний день и обнаружила, что человеческий микробиом – совокупность бактерий, грибов и вирусов, естественных обитателей нашей кожи – значительно меньше, чем у других млекопитающих. Наша кожа – самый большой орган тела и главный барьер для внешней среды. Исследование показало, что микробные сообщества на коже млекопитающих могут со временем меняться параллельно со своими хозяевами, что называется филосимбиозом. Предполагается дополнительно изучить вопрос о том, происходила ли совместная эволюция сообщества микроорганизмов кожи и их хозяев, что является одним из механизмов, который может объяснить их наблюдения за филосимбиозом.

Ross AA, Müller KM, Weese JS, Neufeld JD.
Comprehensive skin microbiome analysis reveals the uniqueness of human skin and evidence for phylosymbiosis within the class Mammalia.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Jun 5. pii: 201801302. doi: 10.1073/pnas.1801302115.

Генетически модифицированные бактерии как новое средство лечения запоров

Сообщество бактерий желудка и кишечника (микробиом кишечника) уникально для каждого человека. Поэтому пробиотики-дженерики не работают во всех случаях.

Генетически модифицированные специалистами Клинического центра индивидуальной медицины Майо (США) бактерии производили большое количество химического триптамина. Этот вещество помогает пищевым продуктам проходить через кишечник с потенциально меньшим риском побочных эффектов, чем другие лекарства от запоров. Триптамин может активировать рецепторы в кишечнике мыши, реагирующие на серотонин, вызывая повышенную секрецию жидкости в толстой кишке, что ускоряет движение пищи через пищеварительную систему. «Синтетические» бактерии стимулируют транспортировку пищи через пищеварительную систему независимо от диеты и микробиома.

Дополнительные доклинические исследования и испытания на людях, вероятно, будут продолжаться не менее трех лет.

Genetically engineered bacteria shows promise as new treatment for constipation [WWW Document], n.d.
URL https://www.news-medical.net/news/20180614/Genetically-engineered-bacteria-shows-promise-as-new-treatment-for-constipation.aspx (accessed 6.14.18).

DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-55-58

Бактериология, 2018, том 3, №1, с. 55–58
Bacteriology, 2018, volume 3, No 1, p. 55–58

Совершенствование биотехнологических процессов получения диагностических препаратов для выявления возбудителя туляремии с использованием иммобилизованных носителей

Т.В.Жарникова, И.В.Жарникова, Ю.М.Евченко

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора», Ставрополь, Российская Федерация

Усовершенствована биотехнология получения иммуноглобулинов флуоресцирующих диагностических за счет использования разработанных бифункциональных сорбентов на носителях отечественного производства, позволяющих проводить одномоментную очистку иммуноглобулинов от несвязавшегося красителя и гетерологичных антител. Данная технология сокращает производственный цикл, обеспечивает низкую себестоимость, экологическую безопасность с сохранением качества диагностических препаратов.

Проведено совершенствование иммунопероксидазного конъюгата для выявления возбудителя туляремии путем иммобилизации фермента-пероксидазы хрена с липосомами, что способствует повышению стабильности и увеличению срока годности диагностической системы. Получены высокоактивные, специфичные иммобилизованные иммунопероксидазные конъюгаты, стабильные в течение 6 лет хранения (срок наблюдения), что в 6 раз превышает стабильность препарата, полученного традиционным методом.

Ключевые слова: иммуноглобулины флуоресцирующие, сорбент, флуоресцеинизотиоцианат, реакция иммунофлуоресценции, хроматографическая очистка, фермент, липосомы, иммунопероксидазный конъюгат

Для цитирования: Жарникова Т.В., Жарникова И.В., Евченко Ю.М. Совершенствование биотехнологических процессов получения диагностических препаратов для выявления возбудителя туляремии с использованием иммобилизованных носителей. Бактериология. 2018; 3(1): 55–58. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-55-58

Improvement of biotechnological processes for the production of diagnostic products for the detection of the causative agent of tularemia using immobilized media

T.V.Zharnikova, I.V.Zharnikova, Y.M.Yevchenko

Stavropol Antiplague Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Stavropol, Russian Federation

Improved biotechnology for the production of immunoglobulins diagnostic fluorescent through the use of designed bifunctional sorbents on the media of domestic production, allowing for single-step purification of immunoglobulins from unbound fluorescent dye and heterologous antibodies. The technology used helps to reduce the production cycle by providing low cost, environmental safety, preserving the quality of diagnostic products.

Improvement of immunoperoxidase conjugate for detection of tularemia pathogen by immobilization of enzyme-horseradish peroxidase with liposomes was carried out, which contributes to stability and increase the shelf life of the diagnostic system. Highly active, specific immobilized immunoperoxidase conjugates stable for six years of storage (observation period) were obtained, which is 6 times higher than the stability of the drug obtained by the traditional method.

Key words: Immunoglobulins fluorescent, absorbent, fluoresceinisothiocyanate, the reaction immunofluorescence assay, chromatographic purification, enzyme, liposomes, immunoperoxidase conjugate

For citation: Zharnikova T.V., Zharnikova I.V., Yevchenko Y.M. Improvement of biotechnological processes for the production of diagnostic products for the detection of the causative agent of tularemia using immobilized media. Bacteriology. 2018; 3(1): 55–58. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-55-58

Для корреспонденции:

Жарникова Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук, химик-эксперт лаборатории подготовки специалистов ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (865-2) 26-0337
E-mail: stavnipchi@mail.ru

Статья поступила 19.01.2018 г., принята к печати 30.03.2018 г.

For correspondence:

Tatiana V. Zharnikova, PhD (Biol.), chemist-expert, specialist training laboratory, Stavropol Antiplague Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare

Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol, 355035, Russian Federation
Phone: (865-2) 26-0337
E-mail: stavnipchi@mail.ru

The article was received 19.01.2018, accepted for publication 30.03.2018

Актуальными остаются задачи по снижению и ликвидации инфекционных заболеваний, в связи с этим основные направления биотехнологии предусматривают получение высокоэффективных, специфических препаратов для экспресс-диагностики особо опасных и других инфекций, а также индикации их возбудителей.

Для выявления возбудителя туляремии применяются различные серологические методы: реакция иммунофлуоресценции (РИФ); иммуноферментный анализ (ИФА) и т.д. Одним из основных компонентов диагностических препаратов являются конъюгат-иммуноглобулины, меченные флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) или ферментом пероксидазой хрена.

Для получения специфичных, стабильных, качественных диагностических препаратов необходимо выполнение основных правил:

• использование специфичных антител для иммобилизации;

• качественная хроматографическая очистка конъюгатов от несвязавшихся компонентов;

• стабилизация препаратов.

Традиционно для выполнения вышеперечисленных пунктов применяются импортные дорогостоящие, а иногда высокотоксичные реактивы.

В настоящее время существует целый спектр применяемых сорбентов и методов иммобилизации, имеющих свои достоинства и недостатки [1–3].

Цель исследования – совершенствование биотехнологических процессов получения диагностических препаратов для выявления возбудителя туляремии с использованием иммобилизованных носителей на основе отечественных реактивов.

Задачи исследования:

1. совершенствование биотехнологических процессов получения иммуноглобулинов флуоресцирующих для выявления возбудителя туляремии путем применения бифункциональных аффинных сорбентов;

2. разработка технологии получения стабильного иммунопероксидазного конъюгата за счет иммобилизации фермента и иммуноглобулинов с липосомами.

Материалы и методы

Первоначально использовали различные сорбенты, технология приготовления которых описана в наших предыдущих работах [4, 5]. Для упрощения и ускорения процесса приготовления сорбентов и их использования для очистки препарата от несвязавшегося ФИТЦ были сконструированы сорбенты с магнитными свойствами.

При выделении иммуноглобулинов [6] использовали сыворотку диагностическую туляремийную сухую для РА производства ФКУЗ «Иркутский государственный научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (ОСО 42-28-28-84-01 П). Концентрацию белка иммуноглобулинов флуоресцирующих определяли спектрофотометрически при λ = 280 нм (максимум поглощения белка) и λ = 495 нм (максимум поглощения ФИТЦ). Очистку от несвязавшегося флуорохрома проводили методом восходящей хроматографии на бумаге. Учет результатов в РИФ проводили на люминесцентном микроскопе «PRIMO STAR iLED».

Конъюгацию иммуноглобулинов с ферментом пероксидазой хрена фирмы Sigma (США), тип VI-A, Rz = 3, проводили после его активирования методом перйодатного окисления по P.K.Nakane, A.Kawaoi (1974) [7]. Лиофилизацию препаратов осуществляли в камере ЛС-500 («Проинтех», Россия) под вакуумом.

При контроле активности и специфичности диагностических препаратов в качестве гомологичных штаммов использовали: *Francisella (F.) tularensis Miura*, *F. tularensis* 890-Аз, *F. tularensis* Schu, *F. tularensis* 15 НИИЭГ. В качестве гетерологичных штаммов применяли: *Brucella (B.) abortus* 544, *B. abortus* 19-ВА, *B. melitensis* 16 М, *B. melitensis* 62/9, *B. suis* 1330, *B. suis* 6, *Yersinia pseudotuberculosis* I-II серовар, *Escherichia (E.) coli* 0-10, *E. coli* 0-18.

Для иммобилизации ферментов использовали липосомы со средним размером 200 нм, полученные методом «выпаривания в обращенной фазе» из фосфолипидов. Чувствительность и специфичность конъюгатов определяли по методике M.Clark и A.Adams (1977) в «сэндвич»-варианте ИФА [8]. В работе использовали полистироловые планшеты для иммунологических реакций (Санкт-Петербург, Россия). Учет результатов проводили на фотометре Multiskan FC (Финляндия).

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли, оценивая дисперсию, стандартное отклонение, доверительный интервал выборки из результатов эксперимента, с использованием компьютерной программы Microsoft Office Excel 2007.

Результаты и обсуждение

Одним из основных экспресс-методов является РИФ, в которой используются иммуноглобулины флуоресцирующие диагностические. Они должны обладать высокой специфичностью, т.е. взаимодействовать только с гомологичным антигеном и сообщать яркую флуоресценцию образующемуся комплексу. Для этого применяются хроматографические методы очистки. С целью освобождения иммуноглобулинов от несвязавшегося красителя используется сефадекс G-25 или сефадекс G-50 [9]. Для истощения иммуноглобулинов от гетерологичных антител – полиакриламидные сорбенты с иммобилизованными антигенами из гетерологичных штаммов. При этом применяются импортные дорогостоящие реактивы, а во втором случае – высокотоксичные.

В связи с этим нами разработана технология получения бифункционального аффинного сорбента, выполняющего одновременно две функции: очистку иммуноглобулинов флуоресцирующих от несвязавшегося красителя ФИТЦ и сорбцию гетерологичных антител путем связывания с антигенным лигандом, конъюгированным с матрицей и представляющим собой водорастворимый антиген, дающий перекрестную реакцию с соответствующими иммуноглобулинами. Используемые при этом сорбенты – биологически и химически инертные, микробиологически устойчивые, механически прочные, стабильные.

В качестве сорбента использовали: синтезированные органокремнеземные носители, состоящие из алюмосили-

ката, оксида железа и декстрана. Для сравнения применяли традиционно используемый сефадекс G-50. Сорбция ФИТЦ на сефадексе была 92 ± 2%, на разработанном органокремнеземном сорбенте – 90 ± 2%.

Для придания сорбентам биоспецифических свойств на их поверхность иммобилизовали водорастворимые антигены, полученные из гетерологичных штаммов: *B. abortus* 544, *B. abortus* 19–ВА.

Всего было проанализировано по 3 серии иммуноглобулинов флуоресцирующих туляремийных, очищенных с помощью аффинного сорбента с магнитными свойствами, с концентрацией белка 1,0–1,1% и молярным отношением Мф/Мб (нагрузка красителя на белок) от 5,0 до 9,0.

Установлено, что специфическая активность препаратов, очистку которых проводили с помощью бифункциональных аффинных сорбентов, составила 1:32–1:64, чувствительность – 5×10^5 и более микробных клеток в 1 мл при отсутствии перекрестных реакций с гетерологичными штаммами.

При сравнительном изучении в РИФ активности и специфичности иммуноглобулинов флуоресцирующих туляремийных, полученных традиционным (с помощью сефадекса G-50) и модифицированным методами, установлена сопоставимость полученных результатов, а с учетом снижения материальных затрат и импортозамещения превосходство предложенного нами метода становится очевидным.

Вторым перспективным экспресс-методом является ИФА. Однако его недостаток – непродолжительный срок годности иммуноферментного конъюгата (6–12 мес при надлежащем хранении в холодильнике), так как ферменты имеют слабожесткую структуру и подвержены отрицательному влиянию внешних факторов среды: температурных, буферных изменений, концентрации водородных ионов и т.д.

Для решения данной проблемы необходимо выбрать носитель и подобрать параметры, при которых процедура иммобилизации не инактивировала бы фермент, позволяя ему функционировать с высокой активностью. Данными свойствами обладают липосомы [10].

При получении липосомально-иммунопероксидазного конъюгата предварительно активировали фермент методом перйодатного окисления. Данная процедура приводила к образованию альдегидных групп в углеводной части фермента пероксидазы хрена. В дальнейшем на наружной мембране липосом фермент фиксировали. Суспензию подвергали ультразвуковой обработке, обеспечивающей эффективный контакт поверхности липидной мембраны липосом с ферментом, после чего смесь инкубировали при температуре (22 ± 4)°С в течение 2 ч. Ковалентное связывание липосом с ферментом осуществлялось за счет части активированных групп пероксидазы и аминогрупп, присутствующих в молекулах ганглиозидов, встроенных в мембрану липосом при их приготовлении. Фиксацию иммуноглобулинов на поверхности липосом с иммобилизованной пероксидазой хрена проводили при температуре (22 ± 4)°С в течение 2 ч. Препарат стабилизировали 5 мг боргидрида в холодильнике. При этом иммуноглобулины за счет свободных аминогрупп связывались с оставшимися свободными альдегидными группами углеводной части пероксидазы. Для очистки конъюгата от несвязавшихся иммуноглобулинов использовали гельхроматографию.

В целях увеличения срока годности препараты разливали в ампулы, замораживали и лиофилизировали в течение (18 ± 2) ч до конечной температуры (25 ± 1)°С.

В результате проведенных исследований разработана технология изготовления иммобилизованных ферментных препаратов, значительно увеличивающая их стабильность. Это связано с тем, что, во-первых, иммобилизация эффективно препятствует вредному воздействию внешней среды на ферментный препарат, он становится заключенным в носитель (липосомы), т.е. защищенным, при отсутствии каталитических ограничений, т.е. матрица не препятствует проникновению к нему субстрата за счет эффективного метода получения липосом, включения фермента и иммобилизации антител, подбора температурных, временных параметров, проведения щадящей очистки от несвязавшихся компонентов.

В готовых диагностических препаратах контролировали физико-химические (растворимость, цветность, прозрачность, потерю в массе при высушивании) и иммунологические свойства (рабочий титр, специфичность, чувствительность) после лиофилизации и в процессе хранения.

Разработанные препараты удовлетворяли требованиям к диагностическим препаратам, а стабильность разработанных иммуноферментных конъюгатов превосходила аналогичный показатель традиционных, срок годности которых не превышал 1 года.

Чувствительность иммунопероксидазных конъюгатов составила 5×10^5–1×10^6 м.к./мл при отсутствии перекрестных реакций с гетерологичными штаммами, что свидетельствовало об их высокой специфичности.

Заключение

В результате экспериментов были получены специфичные, высокоактивные диагностические препараты.

1. Иммуноглобулины флуоресцирующие туляремийные.

Бифункциональность свойств сорбентов позволяла выполнять две задачи. Первая состояла в освобождении иммуноглобулинов флуоресцирующих от несвязавшегося красителя – в результате физической сорбции последнего на сорбенте. Вторая задача включала очистку иммуноглобулинов флуоресцирующих от гетерологичных антител за счет аффинных взаимодействий последних, входящих в состав иммуноглобулинов и соответствующих антигенов, фиксированных на аффинном сорбенте. Отработанная при этом методика может быть использована как основа для получения высокоактивных, специфических иммуноглобулинов флуоресцирующих при выявлении возбудителей других инфекций.

Таким образом, простота технологии, при которой очистка от несвязавшегося красителя и гетерологичных антител производится в одну стадию, способствует сокращению производственного цикла. Предложенная технология позволяет обеспечить низкую себестоимость, экологическую безопасность с сохранением качества диагностических препаратов.

2. Иммунопероксидазный конъюгат.

Фиксируясь на поверхности твердофазных носителей (мембраны липосом), фермент и иммуноглобулины резко снижают способность к конформационным изменениям структуры своих молекул под воздействием повышенной температуры, изменений pH среды и т.д. Все это способ-

ствует повышению стабильности и увеличению срока годности диагностической системы, в 6 раз превышающего срок годности препарата, полученного по традиционной методике.

Таким образом, в результате проведенных исследований изготовлены высокочувствительные (5×10^5–1×10^6 м.к./мл), специфичные (отсутствуют перекрестные реакции с гетерологичными штаммами) диагностические препараты для выявления возбудителя туляремии: иммуноглобулины флуоресцирующие и иммунопероксидазный конъюгат.

Литература

1. Butnariu M, Negrea P, Lupa L, Ciopec M, Negrea A, Pentea M, Sarac I, Samfira I. Remediation of Rare Earth Element Pollutants by Sorption Process Using Organic Natural Sorbents. Int J Environ Res Public Health. 2015 Sep 10;12(9):11278-87. DOI: 10.3390/ijerph120911278
2. Marwa Elkady, Hassan Shokry Hassan, Aly Hashim Immobilization of Magnetic Nanoparticles onto Amine-Modified Nano-Silica Gel for Copper Ions Remediation. Материалы. 2016. № 9. 460. http://www.mdpi.com/1996-1944/9/6/460?utm_source=TrendMD&utm_medium
3. Khlyntseva AE, Belova EV, Zharnikova IV, Tyumentseva IS, Kulichenko AN, Dyatlov IA, Shemyakin IG. Design of a Test System Based on Magnetic Particles with Immobilized Monoclonal Antibodies for Selective Bacillus anthracis Spore Concentration. Applied Biochemistry and Microbiology. 2011;47(7):700-6.
4. Тюменцева ИС, Жарникова ИВ, Афанасьев ЕН, Ефременко ВИ, Коготкова ОИ, Кальной СМ, Куличенко АН. Научно-методические разработки биотехнологий производства иммунобиологических препаратов для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний и детекции их возбудителей. Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. 2015;4(56):21-5.
5. Жарникова ТВ, Ковалев ДА, Жарникова ИВ, Таран ТВ, Михайлова МЕ. Совершенствование биотехнологических процессов получения иммуноглобулинов флуоресцирующих диагностических для выявления возбудителей туляремии и бруцеллеза. Технологии живых систем. 2017;14(3):58-62.
6. Steibuch G, Audran R. The isolation of IgG from imanalion serra with the acid of caprilic. Arch Biochem Biophys. 1969 Nov;134(2):279-84.
7. Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase-labelled antibody-a new method of conjugation. J Histochem Cytochem. 1974 Dec;22(12):1084-91. DOI: 10.1177/22.12.1084
8. Clark MF, Adams AN. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. J Gen Virol. 1977 Mar; 34(3):475-83. DOI: 10.1099/0022-1317-34-3-475
9. Ибрагимов АН, Бикмуллин АГ, Сатаева ДА, Лопухов ЛВ, Зайнуллин ЛИ, Алимова ФК. Хроматографические методы очистки белков. Учебно-методическое пособие. Казань: ФГАОУВПОКФУ, 2013, 48 с.
10. Ефременко ВИ. Липосомы. Монография. Ставрополь, 1999, 236 с.

References

1. Butnariu M, Negrea P, Lupa L, Ciopec M, Negrea A, Pentea M, Sarac I, Samfira I. Remediation of Rare Earth Element Pollutants by Sorption Process Using Organic Natural Sorbents. Int J Environ Res Public Health. 2015 Sep 10;12(9):11278-87. DOI: 10.3390/ijerph120911278
2. Marwa Elkady, Hassan Shokry Hassan, Aly Hashim Immobilization of Magnetic Nanoparticles onto Amine-Modified Nano-Silica Gel for Copper Ions Remediation. Материалы. 2016. № 9. 460. http://www.mdpi.com/1996-1944/9/6/460?utm_source=TrendMD&utm_medium
3. Khlyntseva AE, Belova EV, Zharnikova IV, Tyumentseva IS, Kulichenko AN, Dyatlov IA, Shemyakin IG. Design of a Test System Based on Magnetic Particles with Immobilized Monoclonal Antibodies for Selective Bacillus anthracis Spore Concentration. Applied Biochemistry and Microbiology. 2011;47(7):700-6.
4. Tyumentseva IS, Zharnikova IV, Afanasiev EN, Efremenko VI, Kogotkova OI, Kalnoy SM, Kulichenko AN. Scientific and methodical development of biotechnological production of immunobiological preparations for instant diagnosis of infectious diseases and detection of pathogens. BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2015;4(56):21-5. (In Russian).
5. Zharnikova TV, Kovalev DA, Zharnikova IV, Taran TV, Mikhailova ME. Improvement of biotechnological processes for the production of immunoglobulins diagnostic fluorescent for identification of causative agents of tularemia and brucellosis. Journal Technologies of Living Systems. 2017;14(3):58-62. (In Russian).
6. Steibuch G, Audran R. The isolation of IgG from imanalion serra with the acid of caprilic. Arch Biochem Biophys. 1969 Nov;134(2):279-84.
7. Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase-labelled antibody-a new method of conjugation. J Histochem Cytochem. 1974 Dec;22(12):1084-91. DOI: 10.1177/22.12.1084
8. Clark MF, Adams AN. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. J Gen Virol. 1977 Mar; 34(3):475-83. DOI: 10.1099/0022-1317-34-3-475
9. Ibragimov AN, Bikmullin AG, Sataeva DA, Lopukhov LV, Zainullin LI, Alimova FK. Khromatograficheskie metody ochistki belkov. Kazan, 2013, 48 p. (In Russian).
10. Efremenko VI. Liposomy. Monografiya. Stavropol, 1999, 236 p. (In Russian).

Информация о соавторах:

Жарникова Ирина Викторовна, доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник научно-производственной лаборатории
препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций
ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (865-2) 26-0312
E-mail: stavnipchi@mail.ru

Евченко Юрий Михайлович, врач-эпидемиолог лаборатории подготовки
специалистов ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт»
Роспотребнадзора
Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (865-2) 26-0337
E-mail: stavnipchi@mail.ru

Information about co-authors:

Irina V. Zharnikova, Dr. Sci. (Biol.), leading research worker of science-practical laboratory of preparations for diagnostic of dangerous and other infections,
Stavropol Antiplague Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol, 355035, Russian Federation
Phone: (865-2) 26-0312
E-mail: stavnipchi@mail.ru

Yuri M. Yevchenko, physician-epidemiologist, specialist training laboratory,
Stavropol Antiplague Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol, 355035, Russian Federation
Phone: (8652) 26-0337
E-mail: stavnipchi@mail.ru

DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-59-62

Бактериология, 2018, том 3, №1, с. 59–62
Bacteriology, 2018, volume 3, No 1, p. 59–62

Современные подходы к выделению и очистке холерного тест-токсина

О.С.Дуракова, О.В.Громова, Л.Ф.Ливанова, Н.Г.Авдеева, Ю.И.Самохвалова, А.В.Гаева, М.Н.Киреев, О.А.Волох

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

В данной статье представлены результаты усовершенствования этапов получения холерного тест-токсина. Проведен подбор штамма-продуцента, питательной среды. Определены оптимальные условия для получения максимального выхода антигена.
Ключевые слова: холерная вакцина, штаммы-продуценты, холерный токсин, тест-токсин, питательная среда

Для цитирования: Дуракова О.С., Громова О.В., Ливанова Л.Ф., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И., Гаева А.В., Киреев М.Н., Волох О.А. Современные подходы к выделению и очистке холерного тест-токсина. Бактериология. 2018; 3(1): 59–62. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-59-62

Modern approaches to the selection and prufication of cholera test-toxin

O.S.Durakova, O.V.Gromova, L.F.Livanova, N.G.Avdeeva, Yu.I.Samokhvalova, A.V.Gaeva, M.N.Kireev, O.A.Volokh

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russian Federation

This article presents the work on the improvement of the stages of cholera test-toxin production. Selection of a strain-producer, nutrient medium has been carried out. The optimum conditions for maximum antigen yield have been determined.
Keywords: V. cholerae, cholera vaccine, cholera toxin, nutrient medium

For citation: Durakova O.S., Gromova O.V., Livanova L.F., Avdeeva N.G., Samokhvalova Yu.I., Gaeva A.V., Kireev M.N., Volokh O.A. Modern approaches to the selection and prufication of cholera test-toxin. Bacteriology. 2018; 3(1): 59–62. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-59-62

В связи с эпидемической ситуацией по холере в России и в мире необходима специфическая профилактика этого заболевания. Холерная химическая вакцина, разработанная в РосНИПЧИ «Микроб» и зарегистрированная на территории России, состоит из холерогена-анатоксина и О-антигенов холерного вибриона сероваров Инаба и Огава. Качество компонента вакцины холерогена-анатоксина определяется специфической активностью холерного токсина (ХТ), которая тестируется в соответствии с промышленным регламентом № ПР 01898109–39–17 на производство [1] методами кожной пробы по *Craig* [2], РПИГ [3] и GM_1-ELISA [4]. Количество холерогена-анатоксина в таблетках вакцины определяется по специфической активности антигена в реакции связывания анатоксина. В данных реакциях, а также для получения антихолерогенной сыворотки используется холерный токсин. В связи с этим оптимизация условий получения тест-токсина является чрезвычайно актуальной [5].

Материалы и методы

Для получения токсина используют производственный штамм *Vibrio cholerae cholerae* 569B серовара Инаба. Производный от него штамм *V. cholerae cholerae* КМ76 серовара Инаба – гиперпродуцент холерного токсина, содержит рекомбинантную плазмиду pC0107-2, несущую гены, ответственные за синтез холерного токсина (*ctxAB*), а также гены резистентности к тетрациклину (Tc^r) и канамицину (Km^r). Данный штамм был изучен ранее и внедрен в производство. Штамм *V. cholerae cholerae* КМ68, производный штамма *Дакка* 35 серовара Огава, также содержит рекомбинантную плазмиду pC0107-2 и является гиперпродуцентом холерного

Для корреспонденции:

Дуракова Оксана Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Статья поступила 24.01.2018 г., принята к печати 30.03.2018

For correspondence:

Oksana S. Durakova, junior researcher of the laboratory of cholera Vaccines, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»

Address: 46, Universitetskaya str., Saratov 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

The article was received 24.01.2018, accepted for publication 30.03.2018

токсина. Штамм *V. cholerae eltor* KM234, производный штамм *V. cholerae eltor* MAK757, продуцирует во внешнюю среду повышенное количество ХТ за счет внедрения в хромосому транспозона Tn 5-Mob (Km^r). Штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб».

Все изучаемые штаммы являются типичными для S-формы по морфологическим, культуральным, биохимическим и серологическим свойствам и обладают холерогенными, токсигенными и иммуногенными свойствами в опытах на лабораторных животных.

Для культивирования штаммов использовали несколько питательных сред.

1) Бульон казеиновый pH 8,0 следующего состава: аминный азот – 200 мг%; Na_2HPO_4 – 0,06%; NaCl – 0,5%; пептон – 1%. Данная среда используется для глубинного культивирования штаммов *V. cholerae* 569B Инаба и *V. cholerae* M41 Огава при промышленном производстве российской холерной химической вакцины.

2) Бульон AKI (1,5% бакто-пептона, 0,4% дрожжевого экстракта фирмы «Дифко», 0,5% NaCL, 0,3% $NaHCO_2$). Специально подобранная среда для получения холерного токсина 2-го типа, продуцируемого природными штаммами *V. cholerae* биовара Эль Тор.

3) Жидкая питательная среда на основе ферментативного гидролизата фибрина (содержание аминного азота 100 мг%). Эту среду готовили согласно патенту RU № 2518282 [6, 7]. В качестве питательной основы она содержит ферментативный гидролизат фибрина – из отхода производства иммуноглобулина антирабического, полученный в результате гидролиза препаратом нативной поджелудочной железы. Содержит следующие компоненты (об.%): ферментативный гидролизат фибрина – 0,2; $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$ – 0,05; NaCl – 0,5.

Эффективность жидких питательных сред определяли в условиях малообъемного культивирования штаммов в колбах Эрленмейера (250 мл) на термостатируемом шейкер-инкубаторе Infors Multitron.

Глубинное культивирование холерных вибрионов осуществляли в лабораторном биореакторе Biostat A (Sartorius, Германия) с рабочим объемом 1 л. Технические возможности биореактора позволяли регистрировать и регулировать в режиме реального времени значения температуры, pH, растворенного кислорода, скорости вращения мешалки, подачи воздуха в культуральную жидкость и объемов добавляемых корректирующих веществ [8].

Концентрацию биомассы в пробах определяли турбидиметрически на спектрофотометре Biowave. Активность холерного токсина определяли иммунохимическими (РДП, РПИГ, ИФА) и биологическим (Craig) методами.

Результаты и обсуждение

Первым этапом нашей работы был выбор штаммов-продуцентов холерного токсина. Нами было проведено культивирование штаммов *Vibrio cholerae cholerae* 569B, *V. cholerae* KM76, *V. cholerae* KM68, *V. cholerae* KM234 на различных средах для сравнения уровня биосинтеза холерного токсина.

В качестве питательных сред использовали: AKI (1); бульон казеиновый pH 8,0 – среда сравнения (2); жидкую среду на основе ферментативного гидролизата фибрина (3).

Эффективность жидких питательных сред определяли в условиях малообъемного культивирования в колбах Эрленмейера (250 мл) на термостатируемом шейкер-инкубаторе Infors Multitron в течение 18 ч при температуре 37°C для штамма *V. cholerae* KM234 Km^R, при температуре 30°C для штаммов *V. cholerae* 569B, KM68, KM76. Объем питательной среды при культивировании в колбах составлял 25 мл, скорость вращения платформы – 200 об./мин. Посевной материал (ночная культура) в объеме 1,0 мл. При выращивании штамма *V. cholerae* KM234, содержащего мобильные генетические элементы (МГЭ), для создания селективных условий

Таблица 1. **Малообъемное культивирование штаммов *V. cholerae*-продуцентов холерного токсина**

Штамм *V. cholerae*	Среда	Концентрация, млрд/мл	Содержание холерного токсина			
			РДП*	РПИГ*	ИФА*	Крейг*
KM76 Tc^RKm^R	1	15,2	4	32	128	8000
	2	20,8	4	32	128	16000
	3	17,8	8	32	128	16000
KM68 Tc^RKm^R	1	7,2	4	128	6400	192000
	2	18	2	128	6400	256000
	3	16,4	4	128	6400	256000
569 B	1	16	2	128	800	40000
	2	19,6	2	64	400	32000
	3	19,2	4	128	800	160000
KM234 Km^R	1	5,8	–	128	800	24000
	2	14,4	–	128	1600	160000
	3	9	2	128	1600	160000

*Примечание: *реципрокный титр.*

Таблица 2. **Контроль содержания холерного токсина на этапах его выделения**

Штамм	Стерильный фильтрат			Холерный токсин неочищенный		Холерный токсин после хроматографии		
V. cholerae	ИФА*	РПИГ*	Крейг*	РИД*	ИФА*	ИФА*	Крейг*	Выход (из 1л*)
569B	200	80	10000	16	64	64	40000	500 мкг
KM68 $TcRKm^R$	400	160	80000	16	256	254	120000	950 мкг
KM76 $TcRKm^R$	400	80	100000	16	64	64	40000	600 мкг
KM234 Km^R	64	40	10000	8	32	16	0	180 мкг

*Примечание: *реципрокный титр.*

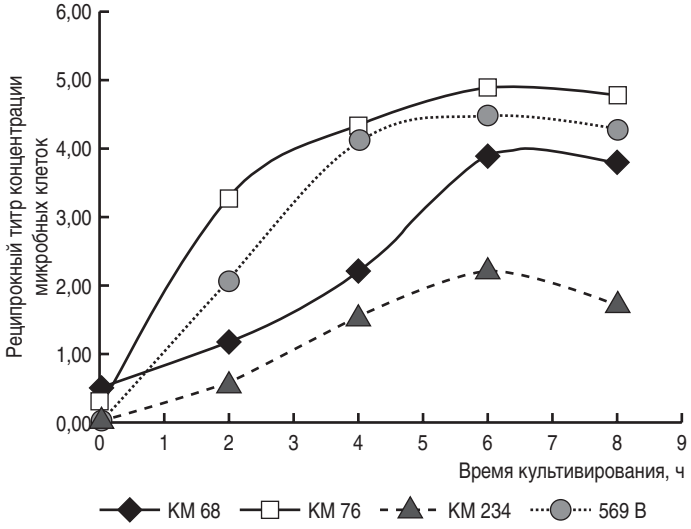


Рис. 1. **Кривые роста штаммов-продуцентов холерного токсина.**

в бульон добавляли канамицин в концентрации 25 мкг/мл. В присутствии указанного антибиотика в среде происходит размножение лишь клеток, содержащих МГЭ, что способствует повышенной экспрессии антигенов, и подавляется рост клеток, спонтанно утративших их. Результаты представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, оптимальной по уровню накопления биомассы и продукции токсина является питательная среда на основе панкреатического гидролизата фибрина.

Следующий этап работы состоял в выявлении оптимальных условий для синтеза холерного токсина при культивировании штаммов-продуцентов на фибриновой среде. Получение антигенов холерных вибрионов осуществляли в экспериментальном биореакторе Biostat A (Sartorius, Германия) с рабочим объемом 1 л, методом периодического культивирования с подпиткой источником углеводного питания и корректировкой pH при закислении культуральной жидкости. В качестве источника углеводного питания использовали глюкозу в виде 40%-ного раствора, а для корректировки уровня pH при закислении культуральной жидкости – раствор аммиака (10%).

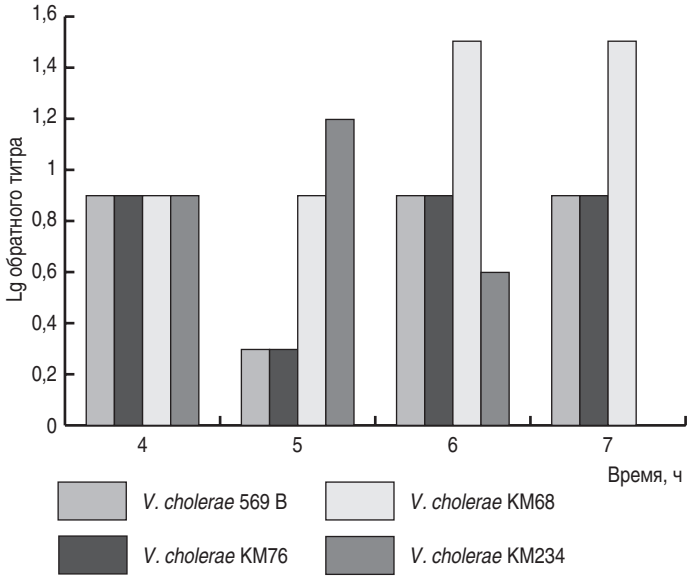


Рис. 2. **Динамика содержания холерного токсина при аппаратном культивировании штаммов-продуцентов.**

Подготовку посевной культуры проводили следующим образом. Агаровую культуру пересевали в пробирку с 5 мл бульона Хоттингера (pH 7,6), подращивали в течение 6 ч при температуре 37°С в тонком слое, затем вносили в качестве инокулята в колбу со 100 мл питательной среды (фибриновый бульон, pH 8,0) и инкубировали в условиях шейкер-инкубатора в течение (17 ± 1) ч. Для посева в биореактор использовали данную бульонную культуру (100 мл). Выращивание в инкубаторе проводили в течение (8 ± 1) ч. Скорость подачи стерильного раствора глюкозы в процессе культивирования составляла: 2–4-й часы роста культуры – 0,1 мл/мин, далее с 5-го по 6–7-й часы культивирования – 1,0 мл/мин в зависимости от pH культуральной жидкости. При значении pH ≤ 7,6 по каплям добавляли стерильный водный раствор аммиака до восстановления значения pH = 8,0. Культивирование холерных вибрионов в биореакторе прекращали по достижении стационарной фазы роста микробной популяции.

Были проведены три цикла культивирования каждого из штаммов холерного вибриона и проанализированы данные по динамике их роста, представленные на рис. 1.

Оказалось, что при культивировании в биореакторе наибольшая концентрация биомассы и продукция холерного токсина была у штаммов *V.cholerae* КМ76 и КМ68. Результаты представлены на рис. 2.

Далее мы анализировали выход конечного продукта – холерного токсина у всех используемых штаммов. Для этого были получены стерильные фильтраты культуральной жидкости. Белковую фракцию, содержащую холерный токсин, осаждали в изоточке (pH 4,1). После диализа все осадки подвергали хроматографической очистке.

Полученный после осаждения, диализа и хроматографической очистки препарат тест-токсина из штамма *V. cholerae* КМ68 показал высокую активность в пробе Крейга – 120 000 и по своим характеристикам соответствовал ОСО тест-токсина для контроля формалинизированного центрифугата, фракций и таблеток вакцины в производстве. Этапы получения препарата показаны в таблице 2.

Таким образом, нами проведены работы по испытанию в экспериментальных условиях штаммов-продуцентов холерного токсина, а также получению и сравнительному анализу тест-токсинов из каждого штамма. Показана возможность использования штамма *V. cholerae* КМ68 для получения тест-токсина, так как его применение дает максимальный выход антигена.

Благодарность

Выражаем благодарность профессору Смирновой Н.И., заведующей лабораторией патогенных вибрионов, за предоставление высокотоксигенных штаммов холерных вибрионов.

Литература

1. Промышленный регламент №ПР 01898109–39–17 на производство Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой.
2. Craig SP, Yamamoto K. Takeda, et al. Production of cholera like enterotoxin by vibrio cholera non-01 strain isolated from the environment. In: Proc. Cholera Res. Symp. Honolulu, Hawaii, 1965 Washington 1965, p. 153.

3. Шагинян ИА, Маракуша БМ. Модификация метода пассивного иммунного гемолиза на плотной среде для выявления продукции термолабильных энтеротоксинов штаммами холерных вибрионов и кишечной палочки. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1983;2:92-6.
4. Маркина ОВ, Алексеева ЛП. Иммуноферментные методы тестирования холерного токсина. Холера и патогенные для человека вибрионы: сб. матер. пробл. Комиссии Науч. Совета по сан.-эпид. Охране территории РФ, 2005, вып. 18, с. 133-135.
5. Москвитина ЭА, Тюленева ЕГ, Самородова АВ, Кругликов ВД, Титова СВ, Иванова СМ, и др. Эпидемиологическая обстановка по холере в мире и России в 2007-2016 гг., прогноз на 2017 г. Проблема особо опасных инфекций. 2017;1:13-20. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-13-20
6. Волох ОА, Антонычева МВ, Авдеева НГ, Вахрушина НИ, Никифоров АК. Питательная среда для глубинного культивирования туляремийного микроба. Патент РФ №2518282. Опубл. 10.06.2014.
7. Смирнова НИ, Щелканова ЕЮ, Баранихина ЕЮ, Агафонов ДА, Тучков ИВ, Краснова ЯМ, Кутырев ВВ. Конструирование и изучение свойств авирулентного генетически измененного штамма Vibrio cholerae биовара Эль Тор с инактивированными генами термолабильного гемолиза и эффективной экспрессией клонированного гена В-субъединицы холерного токсина. Биотехнология. 2017;33(1):30-41. DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-1-30-41
8. Никифоров АК, Комиссаров АВ, Ульянов АЮ, Еремин СА, Волох ОА, Белякова Н.И., Алешина ЮА, Васин ЮГ. Исследование процессов культивирования штаммов холерного вибриона – продуцентов протективных антигенов вакцины холерной бивалентной химической таблетированной в сконструированном биореакторе. Проблемы особо опасных инфекций. 2012;2(112):85-8.

References

1. Promyshlennym reglamentom №PR 01898109–39–17 na proizvodstvo Vaktsina kholernaya bivalentnaya khimicheskaya, tabletki, pokrytye kishechnorastvorimoi obolochkoi. (In Russian).
2. Craig SP, Yamamoto K. Takeda, et al. Production of cholera like enterotoxin by vibrio cholera non-01 strain isolated from the environment. In: Proc. Cholera Res. Symp. Honolulu, Hawaii, 1965 Washington 1965, p. 153.
3. Shaginyan IA, Marakusha BM. Modifikatsiya metoda passivnogo immunnogo gemoliza na plotnoi srede dlya vyyavleniya produktsii termolabil'nykh enterotoksinov shtammami kholernykh vibrionov i kishechnoi palochki. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 1983;2:92-6. (In Russian).
4. Markina OV, Alekseeva LP. Immunofermentnye metody testirovaniya kholernogo toksina. Vol. 18. 2005, pp. 133-135. (In Russian).
5. Moskvitina EA, Tyuleneva EG, Samorodova AV, Kruglikov VD, Titova SV, Ivanova SM, et al. Epidemiological situation on cholera across the globe and in the russian federation in 2007–2016. Forecast for 2017. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2017;1:13-20. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-13-20 (In Russian).
6. Volokh OA, Antonycheva MV, Avdeeva NG, Vakhrushina NI, Nikiforov AK. Pitatel'naya sreda dlya glubinnogo kul'tivirovaniya tulyaremiinogo mikroba. Patent RF №2518282. Opubl. 10.06.2014. (In Russian).
7. Smirnova NI, Shchelkanova EYu, Baranikhina EYu, Agafonov DA, Tuchkov IV, Krasnov YaM, Kutyrev VV. Construction and Investigation of Properties of Avirulent Genetically Altered Strain of Vibrio cholerae biovar El Tor with Inactivated Genes for Heat-Sensitive Hemolysine and Effective Expression of Cloned Cholera Toxin B-subunit Gene. Applied Biochemistry and Microbiology Biotechnology in Russia. 2017;33(1):30-41. DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-1-30-41 (In Russian).
8. Nikiforov AK, Komissarov AV, Ul'yanov AYu, Eremin SA, Volokh OA, Belyakova NI, et al. Examination of Processes of Cultivation of V. cholerae strains - Producers of Protective Antigens of Cholera Bivalent Chemical Vaccine in Tablets - in the Engineered Bioreactor. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2012;2(112):85-8. (In Russian).

Информация о соавторах:

Громова Ольга Викторовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Ливанова Людмила Федоровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Авдеева Наталья Георгиевна, научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Самохвалова Юлия Игоревна, научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Гаева Анна Вячеславовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46.
Телефон: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Киреев Михаил Николаевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Волох Оксана Александровна, кандидат биологических наук, заведующая отделом профилактических препаратов лаборатории холерных вакцин ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5446
E-mail: lhv@microbe.ru

Information about co-authors:

Olga V. Gromova, MD, PhD, senior researcher of the laboratory of cholera vaccines, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Lyudmila F. Livanova, PhD (Biology), senior researcher of the laboratory of cholera vaccines, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Natalia G. Avdeeva, researcher of the laboratory of cholera vaccines, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Julia I. Samokhvalova, researcher of the laboratory of cholera vaccines, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Anna V. Gaeva, PhD (Biology), researcher of the laboratory of cholera vaccines, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Mikhail N. Kireev, MD, PhD, leading researcher of the laboratory of cholera vaccines, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5446
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Oksana A. Volokh, PhD (Biology), head of the department of prophylactic preparations of the laboratory of cholera vaccines, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5446
E-mail: lhv@microbe.ru

DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-63-66

Бактериология, 2018, том 3, №1, с. 63–66
Bacteriology, 2018, volume 3, No 1, p. 63–66

Оценка действия полимерного соединения на процесс формирования микробных биопленок штаммами *Pseudomonas aeruginosa*

Р.А.Верховский[1], О.В.Нечаева[2], Е.И.Тихомирова[2]

[1]ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский университет им. Н.Г.Чернышевского», Саратов, Российская Федерация;
[2]ФГБОУ ВО «Саратовский государственный технический университет им. Ю.А.Гагарина», Саратов, Российская Федерация

Pseudomonas aeruginosa – один из основных возбудителей оппортунистических инфекционных заболеваний человека, особенно часто встречающихся у иммунокомпрометированных пациентов. Это связано со способностью бактерии к формированию микробных биопленок на биотических и инертных поверхностях предметов обихода, госпитальной среды и изделий медицинского назначения, что приводит к формированию множественной устойчивости возбудителя к широкому спектру антимикробных препаратов. В связи с этим разработка методов, препятствующих процессам пленкообразования *P. aeruginosa*, является актуальным направлением биомедицины.
Ключевые слова: Pseudomonas aeruginosa, полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода, ПААГ-М, РЭМ

Для цитирования: Верховский Р.А., Нечаева О.В., Тихомирова Е.И. Оценка действия полимерного соединения на процесс формирования микробных биопленок штаммами *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериология. 2018; 3(1): 63–66. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-63-66

Evaluation of the action of polymer connection on the process of formation of microbial biofiles by *Pseudomonas aeruginosa*

R.A.Verkhovsky[1], O.V.Nechaeva[2], E.I.Tikhomirova[2]

[1]N.G.Chernyshevsky Saratov National Research University, Saratov, Russian Federation;
[2]Yuri Gagarin State Technical University, Saratov, Russian Federation

Pseudomonas aeruginosa is one of the main pathogens of opportunistic human infectious diseases, especially common in immunosuppressed patient. This occurs due to its ability to form microbial biofilms on the biotic and inert surfaces of household items, hospital environment and medical products, which cause pathogen's resistance to a wide range of antimicrobial agents. Hence, the development of methods that hamper the film-forming processes of *P. aeruginosa* is an actual direction of biomedicine.
Keywords: Pseudomonas aeruginosa, polyazolidine ammonium, modified by iodine hydrate ions, PAAG-M, SEM

For citation: Verkhovsky R.A., Nechaeva O.V., Tikhomirova E.I. Evaluation of the action of polymer connection on the process of formation of microbial biofiles by *Pseudomonas aeruginosa*. Bacteriology. 2018; 3(1): 63–66. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-63-66

P. aeruginosa может являться ассоциантом нормальной микрофлоры ряда биотопов организма человека и вызывать оппортунистические инфекционные заболевания различной локализации, которые могут протекать как в острой, так и в хронической форме [1, 2].

В процессе эволюции клетки *P. aeruginosa* приобрели целый комплекс защитных механизмов, что значительно затрудняет лечение вызванных ими заболеваний. В составе генома *P. aeruginosa* закодированы ферменты, обуславливающие резистентность возбудителя к антибиотикам ряда бета-лактамов, аминогликозидов и макролидов [2]. Помимо этого, *P. aerugionsa* благодаря жгутикам, пилям IV типа и растворимым продуктам жизнедеятельности, образующим внеклеточный матрикс, способна формировать биопленки.

Для корреспонденции:

Верховский Роман Аркадьевич, аспирант кафедры «Экология» ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский университет им. Н.Г.Чернышевского»

Адрес: 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83
E-mail: r.a.verhovskiv@mail.ru

Статья поступила 18.01.2018 г., принята к печати 30.03.2018 г.

For correspondence:

Roman A. Verhovsky, graduate student of the department «Ecology», N.G.Chernyshevsky Saratov National Research University

Address: 83 Astrakhanskaya str., Saratov, 410012, Russian Federation
E-mail: r.a.verhovskiy@mail.ru

The article was received 18.01.2018, accepted for publication 30.03.2018

Жгутики, придающие подвижность бактериальным клеткам, способствуют образованию поверхностного монослоя биопленки, а благодаря пилям – и микроколоний на ней [3]. Одним из основных компонентов биопленки являются полисахариды. Окружая себя полисахаридным матриксом, бактериальные клетки маскируют свои антигены, тем самым делая себя невидимыми для компонентов иммунной системы человека [4]. Кроме того, экзополисахариды, входящие в состав биопленки, затрудняют диффузию антибактериальных препаратов и предохраняют бактериальные клетки от негативных воздействий окружающей среды [5].

Биопленки, образуемые *P. aeruginosa*, могут быть плоскими (недифференцированными) либо структурными (дифференцированными). Формирование недифференцированной биопленки происходит путем образования плотного слоя сливающихся клеток [6]. Процесс формирования дифференцированной биопленки начинается с возникновения поверхностных агрегатов и может приводить либо к формированию небольших колоний микроорганизмов, состоящих из подвижной и неподвижной субпопуляций бактериальных клеток, либо к формированию более крупных микроколоний, возникших в ходе клонального роста агрегатов [7].

В связи с этим разработка мер по предотвращению формирования микробных биопленок на инертных поверхностях изделий медицинского назначения является актуальной проблемой биомедицины. Начальным этапом в процессе формирования биопленок является неспецифическая адгезия бактериальных клеток на поверхности субстрата, которая происходит в первые несколько часов культивирования микроорганизмов [8]. Применение биосовместимых полимерных соединений, способных изменять поверхностные свойства субстрата, делая его непригодным для адгезии бактериальных клеток, является перспективным в борьбе с микробными биопленками.

Целью данного исследования являлось изучение действия полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, на процесс формирования микробных биопленок штаммами *P. aeruginosa*.

Материалы и методы

В работе использовали стандартный и клинический штаммы *P. aeruginosa*. Объектом исследования явилось биосовместимое полимерное соединение – полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода (ПААГ-М), производства ООО НПО «Константа» (Россия), для которого ранее были установлены широкий спектр антимикробной активности и низкий уровень токсичности [9–11].

Количественный учет интенсивности пленкообразования проводили по величине связывания микробными биопленками красителя кристаллического фиолетового (ед. OD) [12]. Для этого взвесь исследуемых микроорганизмов с начальной концентрацией клеток 10^5 КОЕ/мл вносили по 100 мкл в ячейки 96-луночных плоскодонных полистирольных планшетов, содержащих в каждой лунке ряда по 100 мкл мясопептонного бульона (МПБ).

Штаммы *P. aeruginosa* культивировали при температуре 37°С в течение 24, 48, 72 и 96 ч. После соответствующей экспозиции планктонные формы клеток удаляли, ячейки планшетов аккуратно промывали стерильной водой и вносили в них по 100 мкл 1%-ного водного раствора кристаллического фиолетового. Через 10 минут краситель удаляли, а лунки трижды аккуратно промывали. Краситель, связанный с биопленками, растворяли в смеси 1÷4 ацетон/этанол и определяли оптическую плотность на спектрофотометре для микропланшетов Epoch «BioTek» (США) при длине волны 420 нм. Контрольные лунки содержали ацетон-этаноловую смесь.

Для формирования микробных биопленок на поверхности катетера его фрагменты помещали в МПБ, содержащий суточные культуры исследуемых штаммов *P. aeruginosa* в концентрации 2×10^5 м.к./мл. Опытные образцы катетера предварительно обрабатывали 0,5%-ным раствором ПААГ-М. Культивирование образцов проводили при температуре 37°С в течение суток, после чего оценивали процесс пленкообразования с использованием сканирующей электронной микроскопии.

Электронно-микроскопическое исследование микробных биопленок на поверхности фрагментов уретрального катетера как модели изделий медицинского назначения проводили с использованием растрового электронного микроскопа Aspex Explorer (FEI Company, США). На поверхность образцов напыляли токопроводящую пленку золота. Микроскопию проводили при ускоряющем напряжении 20 kV, ток эмиссии – 50 μA. Изображение получали во вторичных электронах.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли при помощи пакета программ STATISTICA 6,0.

Результаты и обсуждение

Оценка пленкообразующей способности *P. aeruginosa* позволила установить, что интенсивность связывания красителя стандартными штаммами была в 1,66 раза выше по сравнению с клиническими штаммами (рис. 1).

Обработка лунок иммунологического планшета исследуемым полимерным соединением способствовала нарушению формирования микробных биопленок, что выражалось в снижении интенсивности связывания кристаллического фиолетового стандартным штаммом в 7 раз, а клиническим – в 4,17 раза (критерий Вилкоксона $Z = 2{,}02$, $p < 0{,}05$).

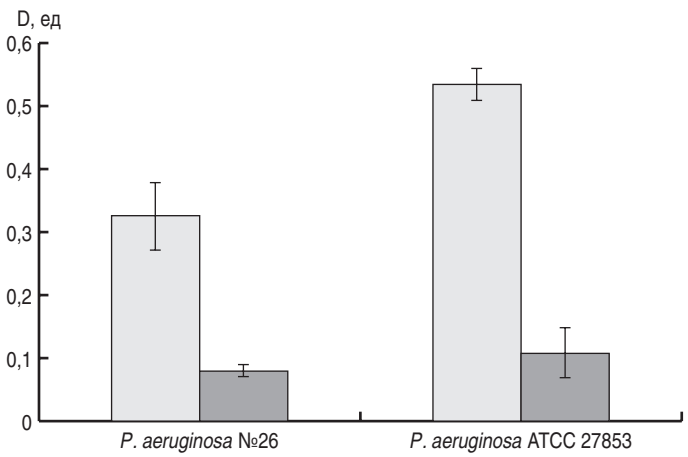


Рис. 1. **Влияние ПААГ-М на процесс формирования микробных биопленок стандартным и клиническим штаммами *P. aeruginosa*.**

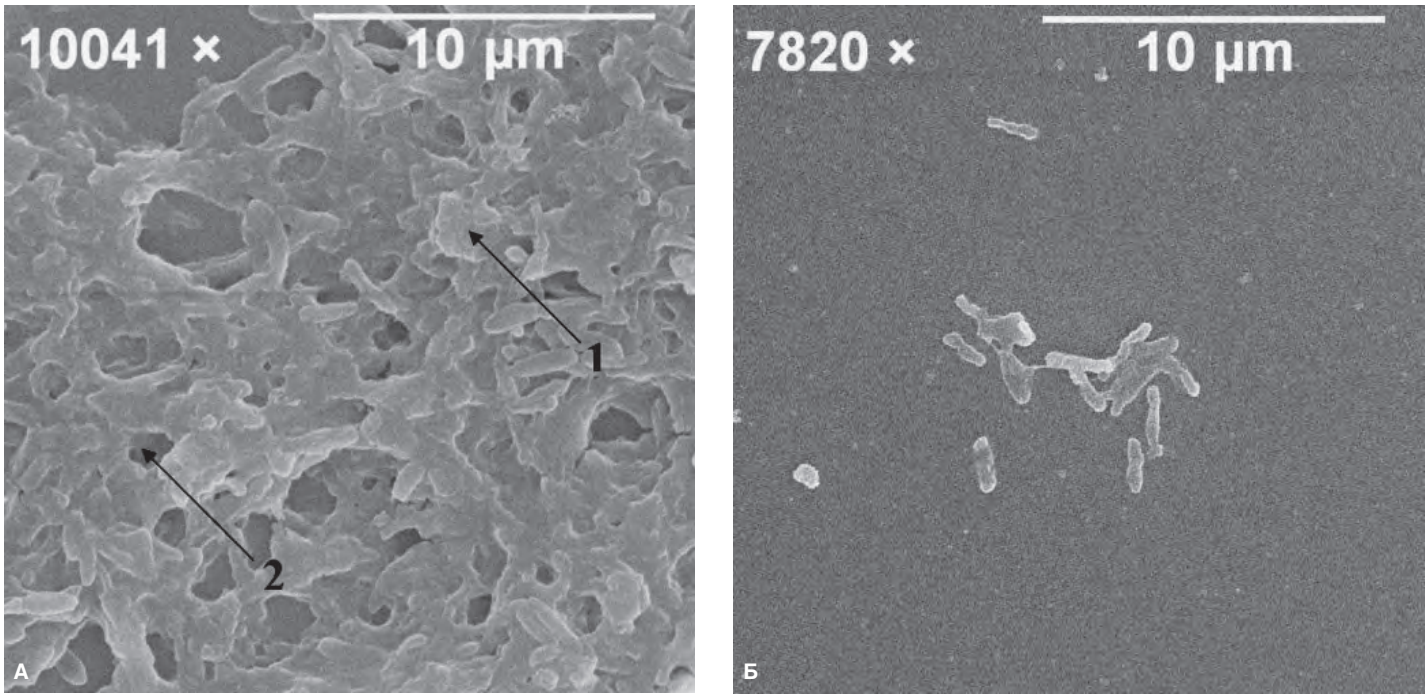


Рис. 2. **Электронная микрофотография микробной биопленки клинического штамма *P. aeruginosa* №26 на поверхности уретрального катетера:** А – контроль: 1 – экзополимерный матрикс; 2 – каналы биопленки; Б – после обработки ПААГ-М.

Поскольку развитие катетер-ассоциированных инфекций связано с формированием микробных биопленок на поверхности изделий медицинского назначения при проведении инвазивных манипуляций, для дальнейших исследований был выбран полиуретановый уретральный катетер, на фрагментах которого в условиях *in vitro* формировали микробные биопленки. Было установлено, что через 24 ч культивирования микробные биопленки, образованные как стандартным, так и клиническим штаммами *P. aeruginosa*, имели сложную трехмерную структуру: бактерии в них формировали многоклеточные слои, покрытые интенсивно выраженным экзополимерным матриксом (рис. 2). В массиве биопленки отмечалось наличие большого количества каналов, через которые осуществляется транспорт питательных веществ, продуктов метаболизма и сигнальных молекул.

На рисунке 2А представлена электронная микрофотография микробной биопленки, образованной клиническим штаммом *P. aeruginosa* №26. В контрольном образце клетки имели размеры, соответствующие их исходным характеристикам, визуализировался интенсивный экзополимерный матрикс, в который были погружены микробные клетки. Через 24 ч культивирования формирование микробной биопленки происходило на всей поверхности образца.

Обработка образцов уретрального катетера сублетальными концентрациями ПААГ-М способствовала нарушению процесса адгезии микробных клеток на его поверхности: отмечали изолированные скопления микробных клеток, расположенные в один слой, размер клеток был в 1,5 раза меньше по сравнению с контрольными (рис. 2Б). Кроме того, наблюдалось практически полное отсутствие экзополимерного матрикса.

С использованием методов спектроскопии и сканирующей электронной микроскопии установлено достоверное нарушение процесса пленкообразования стандартным и клиническим штаммами *P. aeruginosa* при обработке инертных поверхностей лунок иммунологического планшета и образцов уретрального катетера сублетальными концентрациями полимерного соединения ПААГ-М.

Мы предполагаем, что положительно заряженный ПААГ-М способен электростатически связываться с отрицательно заряженными поверхностными структурами клеточной стенки бактерии, тем самым не позволяя им нормально функционировать. Согласно литературным данным, некоторые поверхностные структуры *P. aeruginosa*, такие как пили и жгутики, а также вырабатываемая бактериальными клетками внеклеточная слизь принимают активное участие в процессе пленкообразования. При нарушении их функции можно ожидать снижения активности пленкообразования. Также ПААГ-М, возможно, способен изменять поверхностные свойства субстрата, тем самым нарушая этап неспецифической адгезии и препятствуя образованию первичных поверхностных агрегатов, необходимых для формирования полноценной биопленки.

Полученные в ходе исследования результаты позволяют рекомендовать ПААГ-М для предварительной обработки изделий медицинского назначения и объектов госпитальной среды с целью предотвращения формирования микробных биопленок.

Литература

1. Bjarnsholt T. Biofilm infections. Springer. 2011, 314 p.
2. Vahdani M, Azimi L, Asghari B, Bazmi F, Rastegar Lari A. Phenotypics creening of extended-spectrumss-lactamase and metallo-ss-lactamase in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. Ann Burns Fire Disasters. 2012 Jun 30;25(2):78-81.
3. Moreau-Marquis S, Stanton BA, O'Toole GA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. Pulm Pharmacol Ther. 2008 Aug;21(4):595-9. DOI: 10.1016/j.pupt.2007.12.001.

4. Meluleni GJ, Grout M, Evans DJ, Pier GB. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm in vitro are killed by opsonic antibodies to the mucoid exopolysaccharide capsule butnotby antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients. J Immunol. 1995 Aug 15;155(4):2029-38.
5. Маянский АН, Чеботарь ИВ. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011;1:101-8.
6. Klausen M, Aaes-Jorgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Mol Microbiol. 2003 Oct;50(1):61-8.
7. Klausen M, Gjermansen M, Kreft JU, Tolker-Nielsen T. Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. FEMS Microbiol Lett. 2006 Aug;261(1):1-11. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00280.x
8. Lebeaux D, Chauhan L, Rendueles O, Beloin C. From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections. Pathogens. 2013 May 13;2(2):288-356. DOI: 10.3390/pathogens2020288
9. Нечаева ОВ, Веденеева НВ, Вакараева ММ, и др. Комплексная оценка токсичности полимерного соединения, обладающего антимикробной активностью. Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2016;16(2):160-4. DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-2-160-164
10. Шуршалова НФ, Миндибекова ДЕ, Заярский ДА, Нечаева ОВ. Изучение антибактериальной активности новых препаратов на основе модифицированного биосовместимого полимера. Сборник: Наука и образование в жизни современного общества сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции в 14 томах. 2015, с. 156-159.
11. Нечаева ОВ, Ульянов ВЮ, Заярский ДА, Тихомирова ЕИ, Вакараева ММ. Влияние биосовместимого полимерного соединения на выживаемость возбудителей инвазивных микозов. Проблемы медицинской микологии. 2014; 16(2):106.
12. Тец ВВ. Микроорганизмы и антибиотики. Инфекции кожи, мягких тканей, костей и суставов. СПб.: КЛЕ Т, 2006, 128 с.

References

1. Bjarnsholt T. Biofilm infections. Springer. 2011, 314 p.
2. Vahdani M, Azimi L, Asghari B, Bazmi F, Rastegar Lari A. Phenotypics creening of extended-spectrumss-lactamase and metallo-ss-lactamase in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. Ann Burns Fire Disasters. 2012 Jun 30;25(2):78-81.
3. Moreau-Marquis S, Stanton BA, O'Toole GA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. Pulm Pharmacol Ther. 2008 Aug;21(4): 595-9. DOI: 10.1016/j.pupt.2007.12.001.
4. Meluleni GJ, Grout M, Evans DJ, Pier GB. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm in vitro are killed by opsonic antibodies to the mucoid exopolysaccharide capsule butnotby antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients. J Immunol. 1995 Aug 15;155(4):2029-38.
5. Mayansky AN, Chebotar IV. Staphylococcal biofilms: structure, regulation, rejection. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2011;1: 101-8. (In Russian).
6. Klausen M, Aaes-Jorgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Mol Microbiol. 2003 Oct;50(1):61-8.
7. Klausen M, Gjermansen M, Kreft JU, Tolker-Nielsen T. Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. FEMS Microbiol Lett. 2006 Aug;261(1):1-11. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00280.x
8. Lebeaux D, Chauhan L, Rendueles O, Beloin C. From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections. Pathogens. 2013 May 13;2(2):288-356. DOI: 10.3390/pathogens2020288
9. Nechaeva OV, Vedeneeva NV, Vakaraeva MM, Tikhomirova EI, Shurshalova NF, Zayarskiy DA, et al. Complex Assessment of Toxicity of the Polymeric Connection Possessing Antimicrobic Activity. Izvestiya of Saratov University. New Series. Series: Chemistry. Biology. Ecology. 2016;16(2):160-4. DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-2-160-164 (In Russian).
10. Shurshalova NF, Mindibekova DE, Zayarskii DA, Nechaeva OV. Izuchenie antibakterial'noi aktivnosti novykh preparatov na osnove modifitsirovannogo biosovmestimogo polimera. Sbornik: Nauka i obrazovanie v zhizni sovremennogo obshchestva sbornik nauchnykh trudov po materialam Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii v 14 tomakh. 2015, pp. 156-159. (In Russian).
11. Nechaeva OV, Ul'yanov VYu, Zayarskii DA, Tikhomirova EI, Vakaraeva MM. Vliyanie biosovmestimogo polimernogo soedineniya na vyzhivaemost' vozbuditelei invazivnykh mikozov. Problems in Medical Mycology. 2014;16(2):106. (In Russian).
12. Tets VV. Mikroorganizmy i antibiotiki. Infektsii kozhi, myagkikh tkanei, kostei i sustavov. St. Petersburg, 2006, 128 p. (In Russian).

Информация о соавторах:

Нечаева Ольга Викторовна, кандидат биологических наук,
доцент кафедры «Экология» ФГБОУ ВО «Саратовский
государственный технический университет им. Ю.А.Гагарина»
Адрес: 410054, Саратов, ул. Политехническая, 77
Телефон: (8452) 99-8530
E-mail: olaav.nechaeva@rambler.ru

Тихомирова Елена Ивановна, доктор биологических наук, профессор,
заведующая кафедрой «Экология», ФГБОУ ВО «Саратовский
государственный технический университет им. Ю.А.Гагарина»
Адрес: 410054, Саратов, ул. Политехническая, 77
Телефон: (8452) 99-85-30
E-mail: tichomirova ei@mail.ru

Information about co-authors:

Olga V. Nechaeva, PhD (Biol.), associate professor of the department "Ecology",
Yuri Gagarin State Technical University, Saratov, Russian Federation
Address: 77 Politekhnicheskaya str., Saratov, 410054, Russian Federation
Phone: (8452) 99-8530
E-mail: olaav.nechaeva@rambler.ru

Elena I. Tikhomirova, Dr. Sci. (Biol.), professor, head of the department
of ecology, Yuri Gagarin State Technical University
Address: 77 Politekhnicheskaya str., Saratov, 410054, Russian Federation
Phone: (8452) 99-8530
E-mail: tichomirova ei@mail.ru

DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-67-70

Бактериология, 2018, том 3, №1, с. 67–70
Bacteriology, 2018, volume 3, No 1, p. 67–70

Идентификация и изучение антибиотикорезистентности бактерий, выделенных из маститного молока

Л.С.Киреева, С.А.Макавчик

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Цель – выделение из молока при маститах коров чистой культуры возбудителей и их идентификация, а также изучение чувствительности выделенной культуры к антибиотикам, выявление генов приобретенных карбапенемаз групп KPC и OXA-48-подобных (типы OXA-48 и OXA-162) и класса металло-β-лактамаз групп VIM, IMP, NDM методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).
Выделенная культура возбудителя – *Klebsiella pneumoniae* высокочувствительна только к цефотаксиму и чувствительна к другим препаратам из группы цефалоспоринов, а также к левомицетину, ципрофлоксацину. Малочувствительна к амикацину, фурадонину. К фосфомицину, гентамицину, эритромицину, доксициклину резистентна. У изучаемых культур не выявлены гены приобретенных карбапенемаз групп KPC и OXA-48-подобных, а также класса металло-β-лактамаз групп VIM, IMP и NDM.
Ключевые слова: идентификация, антибиотикорезистентность, антибактериальные препараты, Klebsiella pneumoniae, гены, полимеразная цепная реакция

Для цитирования: Киреева Л.С., Макавчик С.А. Идентификация и изучение антибиотикорезистентности бактерий, выделенных из маститного молока. Бактериология. 2018; 3(1): 67–70. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-67-70

Identification and study of the antibiotic-resistance of bacteria from mastitide milk

L.S.Kireyeva, S.A.Makavchik

St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

The purpose of the study was to isolate and to identify a pure culture of causative agent from milk of cows with mastitis, to study its sensitivity to antibacterial drugs and to detect carbapenemase genes of KPC and OXA-48-like groups (OXA-48 and OXA-162 types) and metal-β-lactamases class of the VIM, IMP, NDM groups by the Real-time polymerase chain reaction (PCR) method. The isolated culture of microorganisms – Klebsiella pneumoniae, is highly sensitive only to cefotaxime. It is sensitive to ceftazidime, cefuroxime, ceftriaxone, i.e. to all drugs from the group of cephalosporins, and to levomycetin, ciprofloxacin. It is insensitive to amikacin, furadonin. The isolated culture is resistant to phosphomycin, gentamicin, erythromycin, and doxycycline. The genes of carbapenemase of KPC and OXA-48-like groups and of metallo-β-lactamases class of VIM, IMP, NDM groups in studied cultures were not detected.
Klebsiella pneumoniae showed multiple antibiotic resistance. The genes of the acquired carbapenemases of the KPC and OXA-48-like groups (types OXA-48 and OXA-162) and of the class of metal-β-lactamases of the VIM, IMP, NDM groups were not detected in the isolated culture.
Keywords: identification, antibiotic resistance, antibacterial drugs, Klebsiella pneumoniae, genes, polymerase chain reaction

For citation: Kireyeva L.S., Makavchik S.A. Identification and study of the antibiotic-resistance of bacteria from mastitide milk. Bacteriology. 2018; 3(1): 67–70. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-67-70

Бактерии рода *Klebsiella* относятся к семейству *Enterobacteriaceae* и широко распространены в природе. Они являются представителями резидентной микрофлоры кишечника различных видов животных и человека и входят в состав условно-патогенной микрофлоры. При снижении иммунного статуса организма представители данного рода, в том числе *Klebsiella pneumoniae*, способны вызывать различные заболевания, в том числе и маститы у коров [1, 2]. Именно маститы являются одной из главных причин преждевременной выбраковки продуктивных

Для корреспонденции:

Киреева Лидия Сергеевна, студентка факультета ветеринарной медицины ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины»

Адрес: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5
Телефон: (812) 388-3631
E-mail: lidia.kireeva@yandex.ru

Статья поступила 28.01.2018 г., принята к печати 30.03.2018

For correspondence:

Lidia S. Kireyeva, student, faculty of veterinary medicine,
St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine

Address: 5 Chernigovskaya str., St. Petersburg, 196084, Russian Federation
Phone: (812) 388-3631
E-mail: lidia.kireeva@yandex.ru

The article was received 28.01.2018, accepted for publication 30.03.2018

животных и систематического недополучения молока за лактацию [3].

Под антибиотикорезистентностью понимают сохранение микроорганизмами способности к росту и размножению в присутствии концентрации антибактериальных препаратов, создаваемой при введении терапевтических доз препарата. Появление устойчивости к действию антибиотиков является частным примером микроэволюционных изменений, развивающихся в популяции любых микроорганизмов, испытывающих воздействие неблагоприятных факторов. Основная проблема антибиотикотерапии заключается в том, что ненадлежащее использование антибактериальных препаратов способствует появлению антибиотикорезистентных штаммов [4].

Антибиотикорезистентность всегда обусловлена генетически и возникает за счет изменения собственных или приобретения новых, а также изменения уровня экспрессии уже имеющихся генов [5]. Однажды возникшие гены резистентности в условиях продолжающейся селекции, в качестве которой выступает антибиотикотерапия, приобретают тенденцию к распространению в популяциях микроорганизмов, причем не ограниченную одним видом [6].

Под приобретенной устойчивостью понимают свойство отдельных штаммов бактерий сохранять жизнеспособность при тех концентрациях антибиотиков, которые подавляют основную часть микробной популяции. Формирование резистентности во всех случаях обусловлено генетически: приобретением новой генетической информации или изменением уровня экспрессии собственных генов [7].

β-лактамазы – группа бактериальных ферментов, направленных на борьбу с β-лактамными антибиотиками, одними из самых часто применяемых препаратов для лечения инфекционных заболеваний [8]. Именно поэтому для исследования были выбраны следующие классы β-лактамаз: KPC и OXA-48-подобные (типы OXA-48 и OXA-162) и класс металло-β-лактамаз групп VIM, IMP, NDM [9, 10].

Целью исследования является оценка антибиотикорезистентности бактериальных агентов, содержащихся в пробах молока. В соответствии с целью были поставлены задачи: выделение и идентификация возбудителей мастита, анализ их антибиотикорезистентности.

Материалы и методы

В промышленном животноводческом комплексе Ленинградской области были отобраны пробы молока коров со скрытыми и клинически проявляющимися маститами. Пробы молока (30–50 мл) брали в стерильные пластиковые емкости после тщательной обработки вымени мыльным раствором, дезинфекции сосков 70% этиловым спиртом и сдаивания первой порции молока в отдельную посуду.

Первичные посевы делали на мясо-пептонный агар и бульон (МПА и МПБ), на кровяной агар, среды Эндо. Для идентификации возбудителя изучали культурально-биохимические свойства чистых культур бактерий. Идентификацию также проводили при помощи тест-систем API 20E («Bio Merieux», Франция), предназначенных для биохимической идентификации энтеробактерий в течение 18–24 ч. Для исследования использовали изолированную колонию со среды первичного посева, суспендировали и вносили в микропробирки по 100 мкл. Затем добавляли по 50 мкл вазелинового масла в микропробирки с тестами на уреазу, лизиндекарбоксилазу, орнитиндекарбоксилазу, аргининдигидролазу, сероводород. Посевы инкубировали при 36°С в течение 24 ч, после чего добавляли реактивы на ацетоин, индол, триптофандезаминазу, нитриты.

Результаты учитывали визуально, заполняли бланки с кодами цифрового профиля. Идентификацию проводили по идентификационной таблице, поставляемой в комплекте с тест-системой.

Определение чувствительности бактериальной культуры к антибактериальным препаратам проводили методом диффузии антибиотиков в агар с применением дисков (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера).

Выявление генов приобретенных карбапенемаз групп KPC и OXA-48-подобных (типы OXA-48 и OXA-162) и класса металло-β-лактамаз групп VIM, IMP, NDM проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Результаты и обсуждение

В результате идентификации, путем изучения морфологических, культурально-биохимических свойств и использования тест-системы API 20e (рис. 1), выделенный возбудитель отнесли к роду *Klebsiella*, виду *Klebsiella pneumoniae* (таблица).

Клебсиеллы представляли собой мелкие, грамотрицательные палочки. При микроскопии у возбудителей выявляли капсулу, которая при окраске метиленовым синим Леффлера по Михину приобретала розовый цвет, бактериальные клетки имели синий цвет.

Таблица. **Результаты использования тест-системы API 20e**

Название ячейки (микропробирки) и реакции/фермента	Результат
OPNG (β-галактозидаза)	– (в идентификационной таблице в 99% случаев +)
ADH (аргининдигидролаза)	+ (в идентификационной таблице в 99% случаев –)
LDC (лизиндекарбоксилаза)	+
ODC (орнитиндекарбоксилаза)	+ (в идентификационной таблице в 99% случаев –)
CIT (утилизация цитратов)	– (в идентификационной таблице в 86% случаев +)
H_2S (продукция H_2S)	–
URE (уреаза)	–
TDA (триптофандеаминаза)	–
IND (продукция индола)	–
VP (продукция ацетоина)	–
GEL (желатиназа)	–
GLU (сбраживание/окисление глюкозы)	+ (на 55%)
MAN (сбраживание/окисление маннита)	+
INO (сбраживание/окисление инозита)	+
SOR (сбраживание/окисление сорбита)	+
RHA (сбраживание/окисление рамнозы)	+
SAC (сбраживание/окисление сахарозы)	+
MEL (сбраживание/окисление мелибиозы)	+
AMY (сбраживание/окисление амигдалина)	+
ARA (сбраживание/окисление арабинозы)	+

Культуры клебсиелл хорошо росли на простых средах. При росте на МПБ вызывали равномерное помутнение, на поверхности образовывалась слизистая пленка. На МПА через 18–24 ч вырастали серо-белые, слизистые колонии. Консистенцию определяли прикосновением бактериологической петли в процессе отвивки части микробов из колонии.

На среде Эндо после культивирования при 37–38°С в течение 18–24 ч изучаемые культуры образовывали бледно-розовые, слизистые, сливающиеся, приподнимающиеся над поверхностью среды колонии (рис. 2).

При росте на трехсахарном агаре с мочевиной по Олькиницкому происходило пожелтение столбика среды, что указывало на расщепление глюкозы, а красная скошенная часть среды – на отсутствие ферментации сахарозы и лактозы (рис. 3).

Проводили определение чувствительности выделенной культуры возбудителя к антибактериальным препаратам методом диффузии антибиотиков в агар с применением дисков. Учет результатов проводили после 24-часовой инкубации в термостате при температуре 37°С по наличию зон задержки роста, образующихся под воздействием антибактериальных препаратов.

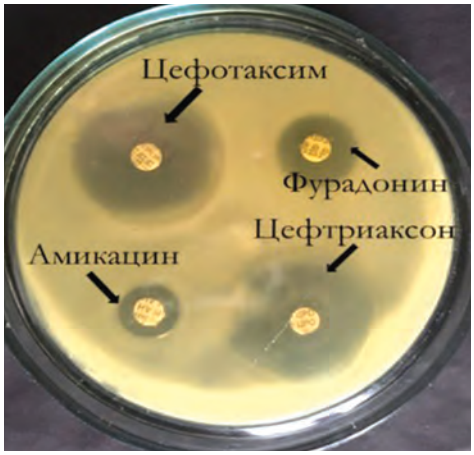
Установлено, что выделенная культура микроорганизмов *Klebsiella pneumoniae* высокочувствительна только к цефотаксиму (рис. 4). Чувствительна также к цефтазидиму, цефуроксиму, цефтриаксону, т.е. ко всем использованным препаратам из группы цефалоспоринов. Была также выявлена чувствительность к левомицетину, ципрофлоксацину (группа фторхинолонов). Данный микроб малочувствителен к амикацину, фурадонину. Отметим, что к фосфомицину, гентамицину, эритромицину, доксициклину выделенная культура резистентна.

В результате проведения ПЦР-РВ генов приобретенных карбапенемаз группы KPC и OXA-48-подобных и класса металло-β-лактамаз групп VIM, IMP и NDM у выделенной культуры обнаружено не было (рис. 5, 6).

Рис. 1. **Результаты исследований на тест-системе API 20e.**

Рис. 2. **Рост *Klebsiella pneumoniae* на среде Эндо.**

Рис. 3. **Рост *Klebsiella pneumoniae* на трехсахарном агаре Олькиницкого.**



- Цефотаксим – 27 мм
- Фурадонин – 16 мм
- Цефтриаксон – 23 мм
- Амикацин – 11 мм

Рис. 4. **Зоны задержки роста возбудителя под воздействием антибиотиков.**

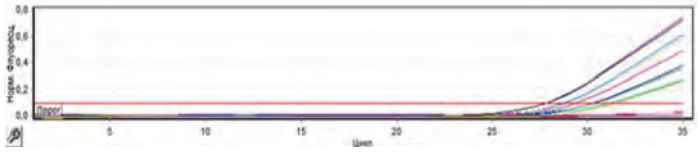


Рис. 5. **График регистрации результатов ПЦР в режиме реального времени свидетельствует о накоплении продуктов амплификации внутренних контролей.**

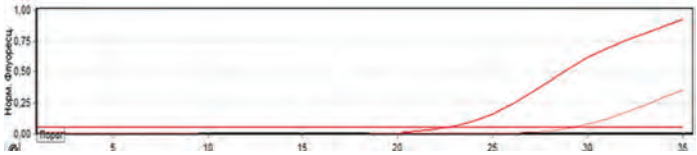


Рис. 6. **График регистрации результатов ПЦР в режиме реального времени свидетельствует о накоплении продуктов амплификации фрагментов генов MBL группы VIM и генов группы OXA-48-подобных.**

Выводы

Выделенные и идентифицированные микроорганизмы *Klebsiella spp*. проявили множественную антибиотикорезистентность. Гены приобретенных карбапенемаз групп KPC и OXA-48-подобных и класса металло-β-лактамаз групп VIM, IMP и NDM у выделенной культуры не обнаружены.

Литература

1. Сиволодский ЕП. Систематика и идентификация энтеробактерий. СПб.: Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Отдел новых технологий, 2011, 21 с.
2. Смирнова ЛИ, Забровская АВ, Приходько ЕИ, Ярикова ВЭ, Гегирова ДМ. Роль бактерий рода Klebsiella при ассоциированных инфекциях коров и телят в условиях промышленного комплекса. Международный вестник ветеринарии. 2014;2:7-12.
3. Багманов МА. Болезни репродуктивных органов и молочной железы у сельскохозяйственных животных. Методическое пособие для студентов факультета ветеринарной медицины. Ульяновск, 2001, с. 47-56.
4. Беляева ЕВ, Борискина ЕВ, Ермолина ГБ, Кичикова ВВ, Любавина НА, Макарова ЕВ, и др. Биологическая характеристика бактерий, колонизирующих слизистые оболочки дыхательных путей, при хронических заболеваниях. Медицинский альманах. 2009;2(7):114-7.
5. Сухинин АА, Макавчик СА, Прасолова ОВ, Виноходова МВ. Применение полимеразной цепной реакции в молекулярной диагностике инфекционных болезней животных. Учебное пособие. СПб.: Изд-во ФГБОУ ВО СПБГАВМ, 2017, 96 с.
6. Митрофанова НН, Мельников ВЛ, Миронова ЕН, Ковешникова ТМ. Динамический анализ особенностей структуры и антибиотикорезистентности микрофлоры многопрофильных лечебно-профилактических учреждений. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. 2008;4:3-10.
7. Сухинин АА, Смирнова ЛИ, Тулева НП, и др. Практикум по диагностике бактериальных болезней животных. СПб.: Издательство ФГБОУ ВПО «СПбГАВМ», 2015, 90 с.
8. Арутюнова ИП, Швец МИ. Микрофлора молока коров при маститах. В кн.: Актуальные проблемы повышения эффективности агропромышленного комплекса. Курск: Курская государственная сельскохозяйственная академия им. профессора И.И.Иванова, 2008, с. 196-8.
9. Islam MR, Ahamed MS, Alam MS. Identification and antibiotic sensitivity of the causative organisms of subclinical mastitis in sheep and goats. Pak Vet. 2012;2(32):179-82.
10. Kumar R, Gupta DK, Bansal BK. Prevalence, current antibiogram and risk factors associated with mastitis in dairy goats in Punjab. International Journal of Science, Environment and Technology. 2016;6(5).

References

1. Sivolodskii EP. Sistematika i identifikatsiya enterobakterii. St. Petersburg: Saint-Petersburg Pasteur Institute, 2011, 21 p. (In Russian).
2. Smirnova L, Zabrovskaya A, Prikhodko E, Yarikova V, Gegirova D. The role of bacteria Klebsiella when associated infections cows and calves in the conditions of an industrial complex. International bulletin of Veterinary Medicine. 2014;2: 7-12. (In Russian).
3. Bagmanov MA. Bolezni reproduktivnykh organov i molochnoi zhelezy u sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh.. Ul'yanovsk, 2001, pp. 47-56. (In Russian).
4. Beliaeva EV, Boriskina EV, Ermolina GB, Kichikova VV, Lubavina NA, Makarova EV, et al. Biological characteristic of bacteria colonizing mucous coat of breathing passages in case of chronic diseases. Medical Almanac. 2009;2(7):114-7. (In Russian).
5. Sukhinin AA, Makavchik SA, Prasolova OV, Vinokhodova MV. Primenenie polimeraznoi tsepnoi reaktsii v molekulyarnoi diagnostike infektsionnykh boleznei zhivotnykh. St. Petersburg, 2017, 96 p. (In Russian).
6. Mitrofanova NN, Mel'nikov VL, Mironova EN, Koveshnikova TM. Dinamicheskii analiz osobennostei struktury i antibiotikorezistentnosti mikroflory mnogoprofil'nykh lechebno-profilakticheskikh uchrezhdenii. University proceedings. Volga region. Medical sciences. 2008;4:3-10. (In Russian).
7. Sukhinin AA, Smirnova LI, Tuleva NP, et al. Praktikum po diagnostike bakterial'nykh boleznei zhivotnykh. St. Petersburg, 2015, 90 p. (In Russian).
8. Arutyunova IP, Shvets MI. Mikroflora moloka korov pri mastitakh. In: Aktual'nye problemy povysheniya effektivnosti agropromyshlennogo kompleksa. Kursk, 2008, pp. 196-8. (In Russian).
9. Islam MR, Ahamed MS, Alam MS. Identification and antibiotic sensitivity of the causative organisms of subclinical mastitis in sheep and goats. Pak Vet. 2012; 2(32):179-82.
10. Kumar R, Gupta DK, Bansal BK. Prevalence, current antibiogram and risk factors associated with mastitis in dairy goats in Punjab. International Journal of Science, Environment and Technology. 2016;6(5).

Информация о соавторе:

Макавчик Светлана Анатольевна, кандидат ветеринарных наук,
доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии,
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины»
Адрес: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д. 5
Телефон: (812) 388-2086
E-mail: groza81@mail.ru

Information about co-author:

Svetlana A. Makavchik, PhD (Vet.), associate professor of the department of microbiology, virology and immunology, St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine
Address: 5 Chernigovskaya str., St. Petersburg, 196084, Russian Federation
Phone: (812) 388-2086
E-mail: groza81@mail.ru

DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-71-73

Бактериология, 2018, том 3, №1, с. 71–73
Bacteriology, 2018, volume 3, No 1, p. 71–73

Использование почвенных сапрофитов *Bacillus spp.* в качестве биоиндикаторов токсикологического загрязнения серой лесной почвы

И.В.Канина, Н.А.Головина

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П.Павлова», Рязань, Российская Федерация

Цель исследования – изучение активности почвенной микрофлоры серой лесной почвы в условиях неблагоприятных факторов – загрязнения тяжелыми металлами, повышенной кислотности для оценки плодородия почвы. В условиях серых лесных почв оценка плодородия почвы с позиции устойчивости на основе проведения микробиологических исследований проводится впервые. Объектом исследований была серая лесная почва разной степени окультуренности: плодородная (окультуренная) и неплодородная (неокультуренная). В неокультуренной серой лесной почве содержание гумуса составляло около 2,2–2,5%, при эколого-экономически обоснованном 3%, элементов питания – среднее. В окультуренной почве гумуса было 5,4%, содержание подвижного фосфора и обменного калия – высокое. Окультуренный вариант отражает потенциальные возможности почвы по обеспечению устойчивости.
Ключевые слова: серая лесная почва, загрязнение, подкисление, устойчивость, биоиндикация, микробиологическая активность

Для цитирования: Канина И.В., Головина Н.А. Использование почвенных сапрофитов *Bacillus spp.* в качестве биоиндикаторов токсикологического загрязнения серой лесной почвы. Бактериология. 2018; 3(1): 71–73. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-71-73

Soil profile *Bacillus spp.* as bioindicators of toxicological pollution of gray forest soil

I.V.Kanina, N.A.Golovina

Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation

The aim of the investigation is studying activity of gray forest soil micro flora under unfavorable factors – heavy metals and high acidity to evaluate soil fertility. This is the first evaluation of gray forest soil fertility from the position of its stability with the help of microbiological investigations. The object of the investigation is gray forest soil of different cultivation degree: fertile (cultivated) and non-fertile (non-cultivated). The non-cultivated gray forest soil has had about 2.2–2.5% of humus when ecological-economic sound 3% and average nutrients. The cultivated soil has had 5.4% of humus and high labile phosphorus and exchange potassium.
Keywords: gray forest soil, pollution, acidification, stability, bio-indication, microbiological activity

For citation: Kanina I.V., Golovina N.A. Soil profile *Bacillus spp.* as bioindicators of toxicological pollution of gray forest soil. Bacteriology. 2018; 3(1): 71–73. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-71-73

Химическая безопасность является важной составляющей в проблеме противодействия медико-экологическим опасностям разнообразных физических, химических и биологических патогенов в окружающей природной, производственной, общественной и бытовой среде, в их влиянии на условия жизни, состояние здоровья и заболеваемость людей [1]. Химическая нагрузка человеческой популяции в современных условиях складывается из широкого круга естественных и искусственных источников. Это не только производственные химические факторы, химические загрязнения воздушной среды и пищевых продуктов, но и проникновение во всевозрастающей степени в почву широкого арсенала различных искусственных материалов и изделий из них, а также продуктов так называе-

Для корреспонденции:

Канина Ирина Владимировна, ассистент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова»

Адрес: 390026, Рязань, ул. Высоковольтная, 7, к. 1
Телефон: (4912) 50-4915
E-mail: kanina.irina1987@yandex.ru

Статья поступила 17.01.2018 г., принята к печати 30.03.2018 г.

For correspondence:

Irina V. Kanina, assistant of the department of microbiology, Ryazan State Medical University

Address: 7/1 Vysokovoltnaya str., Ryazan, 390026, Russian Federation
Phone: (4912) 50-4915
E-mail: kanina.irina1987@yandex.ru

The article was received 17.01.2018, accepted for publication 30.03.2018

мой бытовой химии и медицинской химии, которые имеют определенную токсикологическую характеристику [2]. Могут встречаться скрытые неблагоприятные эффекты, такие как канцерогенные, гонадотоксические, эмбриотоксические и тому подобные последствия, проявление которых в виде соответствующей патологии может обнаруживаться лишь в эпидемиологических исследованиях на популяционном уровне, поскольку количественная выраженность таких событий крайне мала. Однако речь идет о возникающей в массовых по количеству вовлекаемых людей и охватываемым территориям событиях химической опасности, необходимости учета и оценки не только индивидуальных, но также и коллективных (популяционных) доз соответствующих токсичных воздействий. Если надпороговые индивидуальные дозы имеют решающее значение в развитии острой или хронической химической болезни (отравлений), то даже индивидуально малые дозы, подпороговые для развития отравления, но массовые, «нагружающие» большую популяцию и формирующие большую коллективную дозу, по-видимому, могут реализовываться в стохастическую (вероятную) патологию – статистическое повышение уровней отдаленного медицинского ущерба, в том числе наследственных, онкологических, иммунных и т.п. заболеваний.

Почва является главным резервуаром и естественной средой обитания микроорганизмов, которые принимают активное участие в процессах формирования и самоочищения почвы, а также являются необходимым звеном в круговороте всех биогенных элементов (углерода, азота, серы, фосфора, железа и др.). Все почвенные бактерии являются компонентами различных биотических сообществ, складывающихся в почве в процессе их взаимоотношений с растениями, беспозвоночными животными, простейшими, грибами. Именно поэтому важное значение имеет изучение активности почвенной микрофлоры, в частности анаэробной *Bacillus spp*., в условиях неблагоприятных факторов – тяжелых металлов, повышенной кислотности для оценки возможного токсикологического влияния на здоровье человека.

Химическая природа загрязняющих веществ и концентрация их в питательной среде оказывают исключительно большое влияние на жизнедеятельность микробов, определяя в конечном счете качественное распределение микроорганизмов в природе и направленность возбуждаемых ими биохимических процессов. Особенно большое влияние на развитие микроорганизмов оказывает реакция среды (pH), ее окислительно-восстановительный потенциал и наличие в среде ядов и стимуляторов.

Объектом исследований была серая лесная почва разной степени окультуренности: плодородная (окультуренная) и неплодородная (неокультуренная). В неокультуренной серой лесной почве содержание гумуса составляло около 2,2–2,5%, при эколого-экономически обоснованном 3%, элементов питания – среднее. В окультуренной почве гумуса было 5,4%, содержание подвижного фосфора и обменного калия – высокое. Окультуренный вариант отражает потенциальные возможности почвы по обеспечению устойчивости. В опытах имитировали подкисление и загрязнение тяжелыми металлами. Загрязнение почвы производили кадмием из расчета 10, 30 и 100 предельно-допустимой концентрации (ПДК). Экспозиция составляла 1, 10, 35 и 57 сут. Подкисление почвы имитировали добавлением разбавленной серной кислоты из расчета создания кислотной нагрузки 0,018, 0,044 и 0,120 мМ/л. После этого производилось определение микробиологической активности почвы, в частности, определялось количественное соотношение *Bacillus spp*. до внесения химических загрязнителей и после подкисления среды. В окультуренной серой лесной почве не происходило угнетения почвенной микрофлоры от загрязнения кадмием и подкисления. При фоновом pH, равном 6,0, общее количество микроорганизмов составило $41{,}64 \times 10^6$ КОЕ/г, а после добавления кислоты 0,018 мМ/л (pH 5,3) он снизился до $19{,}16 \times 10^6$ КОЕ /г, далее до $15{,}80 \times 10^6$ КОЕ /г и $12{,}00 \times 10^6$ КОЕ /г соответственно при нагрузке 0,044 и 0,120 мМ/л.

Подкисление почвы имитировали добавлением разбавленной серной кислоты из расчета создания кислотной нагрузки 0,018, 0,044 и 0,120 мМ/л. Влажность почвы поддерживали на уровне 30% от сухой почвы. Микробиологическую активность определяли общепризнанными методами. В опыте микробная биомасса при всех предложенных концентрациях кадмия в почве была наибольшей в плодородной почве: при фоновой концентрации она составила для 1-х суток 1187 мкг С/г почвы, 10-х суток – 1590 мкг С/г почвы, 35-х суток – 1005 мкг С/г почвы и 57-х суток – 891 мкг С/г почвы, что соответственно на 540, 761, 541 и 554 мкг С/г почвы больше неплодородного варианта.

При этом разница между вариантами по мере нарастания загрязнения увеличивалась: в 1-е сутки для 10 ПДК она составила 658; 30 ПДК – 667 и 100 ПДК – 710 мкг С/г почвы. В 1-е сутки в плодородном варианте угнетения жизнедеятельности микроорганизмов вообще не произошло, в отличие от неплодородного варианта, так как величина микробной биомассы при указанных концентрациях кадмия была выше фоновой концентрации.

О стабилизации микробиологической жизнедеятельности в плодородной почве за счет лучшего обеспечения экологическими факторами в условиях загрязнения кадмием, а также снижения активности элемента свидетельствуют данные базального дыхания. Во всем диапазоне загрязнения и экспозиции значение его было выше, чем в неплодородной почве. Следовательно, в почве с недостаточным содержанием субстрата микроорганизмы тратят больше энергии на проявление защитных реакций и меньше – на формирование биомассы.

В плодородной почве в отмеченном объеме кислотной нагрузки снижение микробиологической активности не обнаружено. Кроме этого, она во всех случаях была выше неплодородного аналога.

Таким образом, для оценки возможного влияния химического состава почвы на здоровье населения целесообразны различные методы биодиагностики с использованием в качестве объекта почвенной микрофлоры, в частности *Bacillus spp*., как чувствительные системы к откликам на неблагоприятные воздействия. По их сравнительной активности можно регистрировать появление негативных начальных (самых ранних) сигналов в почве с целью определения ожидаемых токсических воздействий на человеческую популяцию.

Литература

1. Ананьева НД. Микробиологические аспекты самоочищения и устойчивости почв. М.: Наука, 2003, 223 с.
2. Anderson JPE, Domsch KH. A physiological method for the quantitave measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol And Biochem. 1978;17(2):197-203.

References

1. Anan'eva ND. Mikrobiologicheskie aspekty samoochishcheniya i ustoichivosti pochv. Moscow: "Nauka" Publ., 2003, 223 p. (In Russian).
2. Anderson JPE, Domsch KH. A physiological method for the quantitave measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol And Biochem. 1978;17(2):197-203.

Информация о соавторе:

Головина Н.А., ассистент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова»
Адрес: 390026, Рязань, ул. Высоковольтная, 7, к. 1
Телефон: (4912) 50-4915

Information about co-author:

N.A.Golovina, assistant of the department of microbiology,
Ryazan State Medical University
Address: 7/1 Vysokovoltnaya str., Ryazan, 390026, Russian Federation
Phone: (4912) 50-4915

Зарубежные научные конференции

July 6th 2018	9th International Research Conference on Science, Health and Medicine 2018 (IRCSHM 2018) Paris, France
July 7th 2018	International Conference on Applied Science, Computing, Artificial & Software Engineering (ACAS-18) Brussels, Belgium
July 12th 2018	2018 Summer Global Nursing Symposium Los Angeles, United States of America
August 3rd 2018	The INTESDA 6th Asian Symposium on Healthcare Without Borders – HWB 2018 Hiroshima, Japan
August 4th 2018	The INTESDA 2nd Asian Conference on Peace, Humanitarian Aid and Service – PHASE 2018 Hiroshima, Japan
August 7th 2018	PATTAYA 12th Intl Conference on Medical Genetics, Cellular & Molecular Biology, Pharmaceutical & Food Sciences Pattaya, Thailand
August 20th 2018	Next Generation Diagnostics Summit 2018 Washington, DC, United States of America
September 2nd 2018	The INTESDA 3rd Asian Symposium on Water, Sanitation and Hygiene – WASH 2018 Tokyo, Japan

Российские научные конференции

17 июля 2018 г.	XIII международная научно-практическая конференция «Химия, физика, биология, математика: теоретические и прикладные исследования». Россия, Москва. Организаторы: ООО «Интернаука»
23 июля 2018 г.	XV Международная научно-практическая конференция «Научный форум: медицина, биология и химия». Россия, Москва. Организаторы: Научный Форум
16 июля 2018 г.	IV Международная научно-практическая конференция «Естественные науки и медицина: теория и практика». Россия, Новосибирск (eLibrary.ru). Организаторы: АНС «СибАК»
30 июля 2018	Всероссийская научно-практическая конференция «Национальная безопасность России: актуальные аспекты». Россия, Санкт-Петербург. Организатор: Гуманитарный национальный исследовательский институт «Нацразвитие»
16–19 июля 2018	II International conference «Bioinformatics: from Algorithms to Applications». Россия, Санкт-Петербург. Организатор: Rustour LLC
20–25 августа 2018	11-я Международная мультиконференция по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии / Bioinformatics of Genome Regulation and Structure Systems Biology – BGRSSB-2018. Россия, Новосибирск. Организатор: ИЦиГ СО РАН

Бактериология, 2018, том 3, №1, с. 74–75
Bacteriology, 2018, volume 3, No 1, p. 74–75

Вакцина чумная молекулярная микроинкапсулированная (ВЧММ)

Группой сотрудников ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора разработан препарат «Вакцина чумная молекулярная микроинкапсулированная», зарегистрированный Министерством здравоохранения Российской Федерации.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Регистрационное удостоверение лекарственного препарата для медицинского применения

ЛП-004808
(номер регистрационного удостоверения лекарственного препарата)

Наименование держателя (владельца) регистрационного удостоверения лекарственного препарата	Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ПМБ), Россия
Адрес местонахождения держателя (владельца) регистрационного удостоверения лекарственного препарата	142279, Московская обл., Серпуховской район, п. Оболенск
Дата государственной регистрации лекарственного препарата	19.04.2018
Срок действия регистрационного удостоверения лекарственного препарата	со сроком действия 5 лет
Дата внесения изменений в регистрационное удостоверение лекарственного препарата (дата замены регистрационного удостоверения лекарственного препарата)	выдано впервые
Информация о зарегистрированном лекарственном препарате:	
Торговое наименование	Вакцина чумная молекулярная микроинкапсулированная (ВЧММ)
Международное непатентованное, или групповое, или химическое наименование	Вакцина для профилактики чумы
Лекарственная форма	лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения
Дозировка	1 доза для подкожного введения (0,5 мл)
Качественный состав и количественный состав действующих веществ и качественный состав вспомогательных веществ	
антиген рекомбинантный F1 25-30 мг, антиген рекомбинантный V 25-30 мг, вспомогательные вещества (полисахарид, полиминеральный сорбент (вермикулит) 10-15), гидролизат альбумина, полиаминокислоты, сорбитол 80, фосфатно-солевой буфер, тиомерсал)	
Форма выпуска (лекарственная форма, дозировка, первичная упаковка, количество лекарственной формы в первичной упаковке, количество первичных упаковок в потребительской упаковке, комплектность)	лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения, 1 доза для подкожного введения (0,5 мл) (флакон) 3 дозы х 3 + растворитель (ампула) 2 мл х 3 (пачка картонная)
Реквизиты нормативной документации	ЛП-004808-190418

014927

Вакцина предназначена для специфической профилактики чумы у людей и представляет собой лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения, 1 доза для подкожного введения – 0,5 мл.

Вакцина состоит из рекомбинантных капсульного антигена и V-антигена чумного микроба, заключенных в микрокапсулы. В одном флаконе содержатся очищенные рекомбинантные антигены: F1-антиген 75–90 мкг и V-антиген 75–90 мкг. Вакцина предохраняет от гибели не менее 70% белых мышей и морских свинок при заражении штаммом *Y. pestis* 231 дозой 10–30 LD50.

Использованы следующие, разработанные авторами штаммы-продуценты протективных антигенов.

Продуцент капсульного антигена чумного микроба

Штамм *Yersinia pseudotuberculosis* EV11M/pFSK3/9 (Номер штамма в «ГКПМ – ОБОЛЕНСК»: В-4785). Штамм получен в лаборатории микробиологии чумы ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск) из штамма *Y. pseudotuberculosis* EV11M (кат. № В-4895) после введения плазмиды pFSK3. Плазмида pFSK3 представляет собой EcoRI фрагмент плазмиды pPst *Y. pestis*, включающий в себя область репликации плазмиды *ori* и гены, кодирующие коагулазную и фибринолитическую активности, продукцию пестицина и иммунность к пестицину, который лигирован с EcoRI фрагментом плазмиды pFSK1, содержащим локус *caf1* оперона *Y. pestis*, маркированный геном *kan*. Полученная конструкция обеспечивает эффективную экспрессию генов *caf1* оперона. Помимо продукции F1 антигена введение в штамм EV11M плазмиды pFSK3 привело к синтезу активатора плазминогена, кодируемого генами плазмиды пестициногенности pPst. В диапазоне температур 28–37°С штамм продуцирует в питательную среду капсульный антиген F1 (Caf1) *Y. pestis*.

Продуцент V-антигена чумного микроба

Штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)/pETV-I-3455 (номер штамма в «ГКПМ – ОБОЛЕНСК»: В-6527). Штамм получен из лабораторного штамма *E. coli* BL21(DE3) путем трансформации клеток штамма плазмидой pETV-I-3455. Отличается от исходного штамма *E. coli* устойчивостью к ампициллину, продукцией V антигена (LcrV(G113)) чумного микроба.

Вакцина предназначена для профилактики чумы личного состава войск Минобороны РФ и МЧС, действующих в чрезвычайных ситуациях, а также населения, проживающего на территориях природных очагов чумы. Показаниями к проведению профилактических прививок являются возможность работы с возбудителем чумы, наличие энзоотий чумы среди грызунов или возможность завоза инфекции, угроза биотеррористического акта. Вакцина может быть использована для массовой вакцинации взрослого контингента лиц от 18 до 55 лет.

В проведенных клинических исследованиях показаны безопасность и удовлетворительная общая переносимость вакцины, что подтверждено результатами лабораторных исследований клинического анализа крови, биохимическими показателями крови и общим анализом мочи.

Продолжительность специфического противочумного иммунитета у добровольцев составляет не менее 90 дней (срок наблюдения) с момента введения вакцины. Доклинические исследования на лабораторных животных показали сохранение защитного иммунитета против чумы в течение 180 сут после иммунизации.

Попытки конструирования субъединичных (химических, молекулярных) вакцин в мире ведутся давно. Кандидаты в вакцины, полученные британскими учеными из военной лаборатории Defence Science and Technology Laboratory (Портон Даун), исследователями из US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (Форт Детрик, США), военными микробиологами из Китая на основе комбинации Caf1 и LcrV белков прошли различные стадии клинических испытаний. Вакцина, разработанная ФБУН ГНЦ ПМБ, является первым зарегистрированным препаратом в мире такого уровня.

23 апреля 2018 года в Париже в рамках деятельности ВОЗ по профилактике опасных инфекций состоялось рабочее совещание «Испытание эффективности вакцин против чумы: конечные точки, пробный дизайн, выбор площадки». Зарегистрированный российский препарат отвечает практически всем требованиям ВОЗ к чумным вакцинам и после проверки у него двух-трех неисследованных, но требуемых по правилам этой организации характеристик, может быть направлен на регистрацию и предквалификацию, которые сделают препарат доступным для закупок мировыми агентствами.

Препарат «Вакцина чумная молекулярная микроинкапсулированная» может быть использован для ревакцинации людей после первичной вакцинации живой чумной вакциной EV, с учетом индивидуального интегрированного показателя гуморального и клеточного иммунитета, что будет во многом способствовать устранению нежелательных реакций организма на введение живой вакцины.

Коллектив авторов вакцины: *Дятлов И.А., Анисимов А.П., Храмов М.В., Дунайцев И.А., Ажермачева Н.И., Сомов А.Н., Иванов С.А., Борзилов А.И., Копылов П.Х., Перелыгин В.В., Жиглецова С.К., Клыкова М.В., Дентовская С.В., Шайхутдинова Р.З., Светоч Т.Э., Панферцев Е.А., Похиленко В.Д., Аитов Р.С., Карлышев А.В., Красильникова В.М.*

О создании Ассоциации «Национальное научно-практическое общество бактериологов»

10 апреля 2018 года Министерством юстиции Российской Федерации зарегистрирована некоммерческая организация Ассоциация «Национальное научно-практическое общество бактериологов» (Association «National scientific-practical society of bacteriologists»).

Основной целью деятельности Ассоциации является объединение юридических и физических лиц, заинтересованных в развитии и совершенствовании бактериологических исследований, направленных на улучшение диагностики инфекционных болезней в сфере здравоохранения, ветеринарии, пищевой промышленности, а также представление и защита общих интересов членов Ассоциации.

Ассоциация имеет достаточно большой спектр видов деятельности: разработка и реализация различных программ и проектов, направленных на изучение, обобщение и распространение передового отечественного и зарубежного опыта в сфере бактериологических исследований; участие, организация и проведение научных съездов, конгрессов, конференций, симпозиумов, семинаров, выставок с целью популяризации достижений науки и практики в области классических методов бактериологических исследований и внедрения их в практику здравоохранения; содействие членам Ассоциации в осуществлении функций, обеспечивающих

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации некоммерческой организации

Ассоциация «Национальное научно - практическое общество бактериологов»

142279, Московская область, р-н Серпуховский, раб. пос. Оболенск, ул. Строителей, д. 1, пом. 2

Решение о государственной регистрации некоммерческой организации при создании принято «10» апреля 2018 г. Управлением Министерства юстиции Российской Федерации по Московской области

Запись о некоммерческой организации внесена в Единый государственный реестр юридических лиц «17» апреля 2018 г. за основным государственным регистрационным номером: 1185000001405

И.о начальника Управления Минюста России по Московской области — К.Ю. Плехов

Учетный № 5014066795

Дата выдачи «22» апреля 2018 г.

достижение управленческих, социальных, научно-практических целей, а также представление законных интересов, содействие защите профессиональных, авторских и смежных прав членов Ассоциации; организация информационного обмена между членами Ассоциации; участие в разработке и дальнейшем внедрении современных методов микробиологической диагностики (культуральных и серологических методов исследований, методов молекулярной микробиологии); координация и объединение усилий научных и практических учреждений и их специалистов, направленных на совершенствование методов выявления возбудителей инфекционных заболеваний; содействие проведению научных исследований в области бактериологии и антибиотикорезистентности инфекционных патогенов; осуществление профессиональных и научных связей со специалистами и обществами других медицинских, биологических и ветеринарных специальностей, развитие международных научных связей; содействие научной, исследовательской, издательской, пропагандистской деятельности среди широкой медицинской, биологической и ветеринарной общественности; участие в разработке научно-обоснованной системы подготовки специалистов по профилю Ассоциации; участие в разработке и экспертизе программ и планов до- и последипломной подготовки специалистов; содействие в разработке, реализации и развитии эффективной защиты интересов производителей и поставщиков медицинских изделий, являющихся членами Ассоциации; участие в порядке, предусмотренном действующим законодательством, в выработке решений органов государственной власти, местного самоуправления в разработке и в реализации программ, связанных с уставной деятельностью Ассоциации; учреждение средств массовой информации, организация просветительской, информационной, экспертно-консультационной деятельности по вопросам уставной деятельности Ассоциации; осуществление издательской деятельности в установленном законодательством порядке, включая выпуск и реализацию информационной литературы, периодических и научно-методических изданий, видеоматериалов, другой продукции по вопросам уставной деятельности Ассоциации и другие.

Учредителями Ассоциации являются ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора и ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н.Блохиной» Роспотребнадзора.

Президентом Ассоциации избран д.м.н., профессор, академик РАН Дятлов Иван Алексеевич, вице-президентом – д.м.н., профессор Ефимов Евгений Игоревич, исполнительным директором – д.б.н. Шепелин Анатолий Прокопьевич.

Таким образом, в сфере научных и прикладных бактериологических исследований, направленных на совершенствование культурального метода выделения и идентификации живых бактериальных культур, создание коллекций бактериальных патогенов, разработку новых высокоэффективных элективных и селективных питательных сред, внедрение экспресс-тестов выявления патогенов, распространение методов гено- и иммунодетекции, подготовку кадров создана триада, призванная решать накопившиеся в данной отрасли проблемы, а именно – Ассоциация «Национальное научно-практическое общество бактериологов», Научно-практический журнал «Бактериология», Ежегодный «Национальный конгресс бактериологов».

Основа агара Байрд–Паркера сухая

С 2018 года ФБУН ГНЦ ПМБ начал выпуск питательной среды для проведения бактериологического исследования клинического материала, предположительно инфицированного стафилококками, с целью выделения возбудителя стафилококковой инфекции и идентификации его принадлежности к патогенным стафилококкам по признаку проявления лецитиназной активности, сухой (Основа агара Байрд–Паркера).

Основа агара Байрд–Паркера с внесенными добавками[1] обеспечивает питательные потребности для визуального обнаружения роста стафилококков, в том числе коагулазоположительных.

Глицин и пируват натрия стимулируют рост стафилококков. Хлорид лития и теллурит калия подавляют рост большинства сопутствующих микроорганизмов. Яичная эмульсия является субстратом, необходимым для определения лецитиназы.

Стафилококки образуют колонии черного цвета в связи с восстановлением теллурита калия до теллура. Реакция с яичным желтком и восстановление теллурита протекают одновременно с действием коагулазы и поэтому могут служить ее показателем.

Питательная среда зарегистрирована в качестве медицинского изделия и имеет регистрационное удостоверение №РЗН 2018/7198 от 23 мая 2018 года.

[1] 2% раствор теллурита калия и желточная эмульсия (в комплект поставки не входят).

Основа агара Фогель–Джонсона сухая

С 2018 года ФБУН ГНЦ ПМБ начал выпуск питательной среды, предназначенной для проведения бактериологического исследования клинического материала, предположительно инфицированного стафилококками, с целью выделения возбудителя стафилококковой инфекции и идентификации его принадлежности к патогенным маннитположительным стафилококкам, сухой (Основа агара Фогель–Джонсона).

Основа агара Фогель–Джонсона с внесенным 2% раствором теллурита калия (в комплект поставки не входит) обеспечивает питательные потребности для селективного роста стафилококков, в том числе маннитположительных.

Хлорид лития и теллурит калия подавляют рост большинства сопутствующих микроорганизмов. Все стафилококки характеризуются наличием фермента – теллуритредуктазы, поэтому образуют колонии черного цвета в связи с восстановлением теллурита калия до теллура. Маннит служит дифференцирующим агентом. Способность стафилококков к ферментации маннита является важным показателем их патогенности.

Питательная среда зарегистрирована в качестве медицинского изделия и имеет регистрационное удостоверение №РЗН 2018/7191 от 23 мая 2018 года.

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