

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2018 • ТОМ 3 • №3

ISSN 2500-1027

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Научно - практический журнал

Главный редактор

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

Ответственный секретарь

И.Г.Говорунов, к.б.н.
(Россия)

Редакционный совет

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

Редколлегия

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

Колонка главного редактора

О микоплазменной инфекции в современный период	5
--	---

Экспериментальные статьи

Изучение геномной организации <i>Chlamydia psittaci</i> с применением алгоритмов метагеномных исследований А.Г.Богун, В.А.Федорова, А.А.Кисличкина, А.А.Сизова, И.А.Дятлов	7
Острые кишечные инфекции в Узбекистане. Динамика выявляемости основных сероваров сальмонелл и их резистентность к антибиотикам Б.И.Алматов, Х.И.Исхакова, И.Х.Маматкулов, А.О.Абдулаев, Л.Т.Ли	14
Опыт применения иммунокорректирующей терапии при ВИЧ-инфекции З.И.Бердиева, П.Е.Игнатов, И.Х.Маматкулов	19
Использование гена, кодирующего белок GamR, в качестве видоспецифического хромосомного маркера для дифференциации <i>B. anthracis</i> от близкородственных видов В.С.Тимофеев, В.В.Каптелова, И.В.Бахтеева, Р.И.Миронова, Г.М.Титарева, Ю.О.Гончарова, Л.И.Маринин, А.Н.Мокриевич	22
Сравнение методов прямого нанесения биомассы и белковых экстрактов при идентификации микроорганизмов рода <i>Listeria</i> методом MALDI-TOF-типирования К.В.Детушев, А.Г.Богун, Т.Н.Мухина, В.И.Соломенцев	28
Опыты по повышению стабильности крови бараньей дефибринированной С.Г.Марданлы, Н.В.Бахилина, Я.В.Мишуткина, М.А.Котляр	34

Обзоры

<i>Vdellovibrio bacteriovorus</i> – уникальный биологический объект с возможной перспективой использования П.В.Слукин, З.М.Ермоленко, Э.А.Светоч, Н.К.Фурсова	38
Микробиологическая порча пищевых продуктов и перспективные направления борьбы с этим явлением З.М.Ермоленко, Н.К.Фурсова	46
Легионеллез и его лабораторная диагностика Б.В.Ерусланов, Э.А.Светоч, И.П.Мицевич	58

Точка зрения

Бактериология и инфекционная экология: новые перспективы исследования проявления патогенных свойств Д.В.Николаенко	68
---	----

Пост-релиз

IV научно-практическая конференция с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности»	78
Форум молодых ученых	81
Правила для авторов	82

BACTERIOLOGY

Scientific and Practical Journal

Editor-in-Chief

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

Executive Secretary

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

Editorial Council

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

Editorial Board

Ad"yaasyren Zeviimyadagiin, PhD (Mongolia)
I.A.Bazikov, Sc.D., prof. (Russia)
L.N.Chernousova, Sc.D., prof. (Russia)
V.A.Davidyants, Sc.D., prof. (Armenia)
S.V.Dentovskaya, Sc.D. (Russia)
L.V.Domotenko, PhD (Russia)
V.A.Gorbunov, PhD (Belarus)
G.A.Karimova, PhD (France)
A.V.Karlyshev, PhD, 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)
S.G.Mardanly, Sc.D. (Russia)
T.V.Meka-Mechenko, Sc.D. (Kazakhstan)
V.L.Motin, prof. (USA)
A.Rakin (Germany)
K.Yu.Shatalin, PhD (USA)
I.G.Shemyakin, Sc.D., prof. (Russia)
A.P.Shepelin, Sc.D. (Russia)
E.A.Svetoch, Sc.D., prof. (Russia)
V.N.Tsarev, Sc.D., prof. (Russia)

Founder and Publisher

© State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Editorial Office:

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

Publisher

© «Dynasty» Publishing House



www.phdynasty.ru

Advertising Department:

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

Editor-in-Chief's Introduction

- On Mycoplasma infection in the modern period 5

Experimental articles

- The study of the genomic organization of *Chlamydia psittaci* by using algorithms for metagenomic research
A.G.Bogun, V.A.Fedorova, A.A.Kislichkina, A.A.Sizova, I.A.Dyatlov 7
- Acute intestinal infections in Uzbekistan. Dynamics of detection of basic salmonella serotypes
and their resistance to antibiotics
B.I.Almatov, Kh.I.Iskhakova, I.Kh.Mamatkulov, A.O.Abdulaev, L.T.Li 14
- Experience of using immunocorringing therapy for HIV infection
Z.I.Berdieva, P.E.Ignatov, I.Kh.Mamatkulov 19
- Using the gen encoding GamR protein as a species-specific chromosomal marker
to differentiate *B. anthracis* from closely related species
V.S.Timofeev, V.V.Kaptelova, I.V.Bakhteeva, R.I.Mironova,
G.M.Titareva, Yu.O.Goncharova, L.I.Marinin, A.N.Mokrievich 22
- Comparing methods of direct application of biomass and protein extracts in identification
of microorganisms of the genus of *Listeria* by MALDI-TOF typing method
K.V.Detushev, A.G.Bogun, T.N.Mukhina, V.I.Solomentsev 28
- Experiences to improve the stability of the defibrinated lamb blood
S.G.Mardanly, N.V.Bahilina, Ya.V.Mishutkina, M.A.Kotlyar 34

Reviews

- Bdellovibrio bacteriovorus* is the unique biological object with possible perspective for use
P.V.Slukin, Z.M.Ermolenko, E.A.Svetoch, N.K.Fursova 38
- Microbiological spoilage of food and promising approaches to combat the phenomenon
Z.M.Ermolenko, N.K.Fursova 46
- Legionellosis and its laboratory diagnosis
B.V.Yeruslanov, E.A.Svetoch, I.P.Mitsevich 58

Point of View

- Bacteriology and Infectious Ecology: new perspectives of research of the pathogenic properties
D.V.Nikolaenko 68

Post-Release

- IV scientific-practical conference with international participation «Bacteriophages: theoretical
and practical aspects of application in medicine, veterinary medicine and food industry» 78
- Young scientist forum 81
- Instructions for Authors 82

О микоплазменной инфекции в современный период

В последние 2–3 года значительно возросло количество инфекций дыхательных путей у детей и у взрослых, вызванных *Mycoplasma pneumoniae*, что определило дополнительный интерес исследователей к этиологии и распространенности данного заболевания.

M. pneumoniae вызывает инфекции верхних и нижних дыхательных путей – трахеобронхиты и пневмонию. Распространяются инфекции эндемично по всему миру вне зависимости от климатических зон, чаще всего регистрируются летом или ранней осенью, установлена положительная корреляция между повышением температуры и возникновением инфекций. Эпидемии имеют циклический характер, происходят каждые несколько лет. Так, с 2010 г. увеличилось число инфекций, вызванных *M. pneumoniae*, в ряде европейских стран, особенно в северных регионах, в тот же период эпидемии были зарегистрированы в Южной Америке и Юго-Восточной Азии.

Выделяемые культуры микоплазм разделяют на 2 основные генетические группы, подтип 1 и подтип 2, на основе различий в гене белка P1. На основе этих данных высказано предположение, что цикличность эпидемий может быть обусловлена переходом от одного подтипа P1 к другому, при утрате популяционного иммунитета к одному из вариантов. Кроме того, часто наблюдаемые смешанные микоплазменные инфекции с бактериями и вирусами, как правило, сопровождаются более тяжелыми формами заболевания.

В связи с внедрением в исследовательскую практику новых методов изучения фено- и генотипических свойств возбудителя, полногеномного секвенирования, оценки биохимических свойств, а также появлением трансгенных животных для моделирования микоплазменной инфекции появилось много новых сведений о возбудителе, которые кратко можно охарактеризовать следующим образом. Одним из основных факторов вирулентности микоплазм является способность к адгезии к эпителиальным клеткам, что позволяет возбудителю повреждать последние и использовать их питательные компоненты для своего размножения, а также дает возможность скользить по поверхности эпителия, распространяясь на другие его участки. Микоплазмы способны образовывать биопленки, защищающие их от внешних воздействий, например, антибиотиков или защитных молекул макроорганизма. Основным адгезином микоплазм является трансмембранный белок P1, а органелла адгезии, обеспечивающая прикрепление, показана на электронной фотографии.

Долгое время считалось, что микоплазмы не имеют токсинов, однако в последнее время был идентифицирован токсин CARDS (community-acquired respiratory distress syndrome), токсин внебольничного синдрома дыхательной недостаточности (дистресс-синдрома), частично схожий с токсином



Waites K.B. et al., 2017

коклюша и являющийся важным фактором вирулентности. CARDS вызывает гиперреактивность дыхательных путей по типу астмы, повреждение клеток эпителия, подавляет врожденный иммунитет хозяина и индуцирует выработку специфических антител. Кроме того, факторами вирулентности микоплазм являются способность к образованию перекиси водорода, синтез липопротеина, обладающего нуклеолитической активностью, и некоторые другие факторы с еще не до конца выясненной функцией.

Лабораторная диагностика строится по стандартному типу, как для всех бактериальных инфекций. Образцами для исследования обычно являются пробы с назофарингеальными или ротоглоточными тампонами, трахеальные аспираты, биоптат ткани легкого, плевральная жидкость, мокрота и бронхоальвеолярный лаваж; из внелегочных образцов – кровь, ликвор, перикардальная жидкость, смывы с кожи или ткани из любого органа. Наилучшим образцом для выявления микоплазм считается мокрота, в которой может содержаться 10^2 до 10^7 КОЕ/мл, тогда как в тампонах из ротоглотки – до 10^3 . Но мокроты часто бывает мало или ее невозможно взять, например у детей. Необходимо использовать специальную транспортную среду для предотвращения высыхания, сохранения жизнеспособности культуры и поддержания стабильности ДНК для исследования методом ПЦР. Эффективной транспортной средой является бульон SP4.

Культивирование микоплазм – длительный процесс, и нечасто используемый на практике, но он пока является

основным для получения изолятов при тестировании антимикробной чувствительности или типирования, поскольку дает абсолютные доказательства инфицирования этим организмом при положительной реакции. Проведенные в США исследования по сравнению генодиагностического метода и метода ПЦР при выявлении микоплазм у почти 1000 пациентов с пневмонией показали, что ПЦР-метод выявил 6% положительных проб на микоплазмы, а культуральный – 5%. Для нашей страны существует необходимость разработки эффективной современной микоплазменной питательной среды и среды для транспортировки образцов, что является основой для их коллекционирования, исследования гено- и фенотипического разнообразия и распространенности.

Антитела в организме человека в основном образуются против адгезина P1 и токсина CARDS. Антитела в основном представлены IgM и появляются в течение 1-й недели после начала болезни и затем в течение 2 нед, достигая пика через 3–6 нед, с последующим снижением.

Коммерческие серологические тесты на *M. pneumoniae* существуют в виде иммуноферментных методов на плашках для выявления отдельно IgM и IgG, мембранный иммуноферментный метод для выявления отдельно IgM или вместе IgM и IgG, непрямого метода для иммунофлуоресцентной микроскопии, а также агглютинации латексных или желатиновых частиц. Наиболее точный результат серологического тестирования *M. pneumoniae* можно получить при одновременном тестировании парных сывороток, полученных с интервалом не менее 2 нед, как на IgM, так и на IgG, при 4-кратном увеличении титра. Разрабатываются эффективные тест-системы на основе рекомбинантных белков микоплазм.

В последнее время показали высокую эффективность при обнаружении микоплазм иммунохроматографические тесты. Наиболее эффективным и прочно вошедшим в практику лабораторий методом выявления микоплазм является ПЦР-диагностика в различных вариантах – RT-ПЦР, мультиплексная ПЦР, чиповые амплификационные технологии, LAMP-технология, основанная на изотермической амплификации. Последняя является наиболее предпочтительной для использования в лабораториях, так как проводится при постоянной температуре, не требует высокого уровня подготовки персонала, менее затратна, чем ПЦР, с удобной визуализацией и возможностью использования в мультиплексном варианте. Для выявления острой микоплазменной ин-

фекции LAMP-технология в мире считается диагностическим тестом первой линии, обеспечивающим получение результата в течение 1 ч после взятия материала у больного. Предпринимаются попытки подобрать дизайн праймеров для осуществления данной технологии для одновременного выявления возбудителя и определения генов его устойчивости к макролидам.

В настоящее время считается, что один тест не может быть достаточным для достоверной диагностики микоплазменной инфекции, а самым чувствительным подходом для постановки диагноза в ранние сроки развития заболевания является комбинация серологического выявления IgM и метода ПЦР в любом чувствительном варианте.

Что касается диагностической значимости масс-спектрометрии с использованием широко распространенных приборов Bruker Biotyper MALDI-TOF MS, то следует отметить, что применение такого подхода дает важную информацию не только относительно принадлежности исследуемой культуры к микоплазмам, но и позволяет достаточно точно дифференцировать их внутри вида. Это важно для коллекционной деятельности и решения молекулярно-эпидемиологических задач, но требует наличия чистой культуры возбудителя, получение которой занимает достаточно длительное время.

Таким образом, учитывая, что микоплазменная инфекция получает в последние годы все большее распространение среди людей вообще и в частности в России, следует считать необходимым развитие диагностических методологий на основе культуральных методов исследования с целью коллекционирования и определения лекарственной устойчивости штаммов (среды для выделения и транспортировки), генетического анализа для целей ранней диагностики и генотипирования возбудителя (мультиплексная ПЦР, LAMP-технология, полногеномное секвенирование), иммунохимических методов выявления в быстрых тестах антигенов микоплазм и антител к ним (иммунохроматографические и латексные тесты).

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

Изучение геномной организации *Chlamydia psittaci* с применением алгоритмов метагеномных исследований

А.Г.Богун¹, В.А.Федорова², А.А.Кисличкина¹, А.А.Сизова¹, И.А.Дятлов¹

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

²ФГБУН «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», филиал в Саратове, Саратов, Российская Федерация

В работе приведено описание биоинформационных методов исследований, использованных для анализа геномов *Chlamydia psittaci*. Данный микроорганизм является облигатным внутриклеточным паразитом, культивирование которого возможно только с использованием живых эукариотических клеток. Особенность препаратов ДНК, получаемых из подобных образцов, заключается в значительном содержании нуклеиновых кислот из эукариотических клеток. В работе изучена эффективность методов биоинформационного анализа для осуществления сборки геномных последовательностей *Chlamydia psittaci*.

Ключевые слова: геномное секвенирование, биоинформационный анализ, внутриклеточные паразиты

Для цитирования: Богун А.Г., Федорова В.А., Кисличкина А.А., Сизова А.А., Дятлов И.А. Изучение геномной организации *Chlamydia psittaci* с применением алгоритмов метагеномных исследований. Бактериология. 2018; 3(3): 7–13. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-7-13

The study of the genomic organization of *Chlamydia psittaci* by using algorithms for metagenomic research

A.G.Bogun¹, V.A.Fedorova², A.A.Kislichkina¹, A.A.Sizova¹, I.A.Dyatlov¹

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

²Federal Research Center of Virology and Microbiology, Branch in Saratov, Saratov, Russian Federation

The paper describes bioinformatic methods applied to analyze *Chlamydia psittaci* genomes. The microorganism is an obligate intracellular parasite, whose cultivation in living eukaryotic cells is possible only. DNA preparations obtained from such samples are characterized by high content of eukaryotic cell nucleic acids. The paper evaluates the efficiency of the bioinformatic analysis in assembling *Chlamydia psittaci* genomic sequences.

Keywords: genomic sequencing, bioinformatics analysis, intracellular parasites

For citation: Bogun A.G., Fedorova V.A., Kislichkina A.A., Sizova A.A., Dyatlov I.A. The study of the genomic organization of *Chlamydia psittaci* by using algorithms for metagenomic research. Bacteriology. 2018; 3(3): 7-13. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-7-13

Современные способы изучения бактерий включают большое количество молекулярно-генетических методов: полимеразная цепная реакция, гибридизация со специфическими последовательностями ДНК, анализ кривых плавления высокого разрешения, определение нуклеотидных последовательностей бактериальных генов и геномов. Наиболее информативные способы анализа бактериальных генов основываются на высокопроизводительном параллельном секвенировании [1, 2]. Главной отличительной осо-

бенностью этих методов является возможность получения информации о структуре всех генов, входящих в состав бактериальных хромосом и плазмид. Другая их важная особенность в том, что они дают возможность изучения некультивируемых бактерий, а также бактерий, для которых невозможно получение чистой культуры.

Хламидии являются облигатными внутриклеточными паразитами, культивирование которых возможно только на живых клетках. Для лабораторных исследований их культи-

Для корреспонденции:

Богун Александр Геннадьевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0000
E-mail: bogun62@mail.ru

Статья поступила 17.06.2018 г., принята к печати 29.10.2018 г.

For correspondence:

Alexander G. Bogun, Cand. Sci. (Biol.), Head of Microbial Collection Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0000
E-mail: bogun62@mail.ru

The article was received 17.06.2018, accepted for publication 29.10.2018

вируют в куриных эмбрионах [3]. Однако при работе с подобными образцами могут возникать сложности, связанные с наличием примесей ДНК из клеток куриного эмбриона в конечном препарате.

В этом исследовании нами описан алгоритм биоинформационного анализа данных высокопроизводительного секвенирования, полученных при анализе образца ДНК, выделенного из хламидий, выращенных на культуре клеток куриного эмбриона. Установлено, что ДНК хозяйского организма в изучаемом образце составляет 96%. Показана высокая эффективность данного метода анализа по отношению к другим используемым алгоритмам обработки данных.

Объектами исследования являются архивы ридов полногеномного секвенирования, алгоритмы фильтрации и идентификации таксономической принадлежности полученных нуклеотидных последовательностей.

Материалы и методы

Для проведения исследования использованы архивы парных ридов высокопроизводительного параллельного секвенирования в формате fastq. Каждый архив состоял из 2 376 938 ридов длиной 220 оснований.

Для биоинформационной обработки данных использовали программы bowtie2 (версия 2.2.4), последовательности куриного генома galGal5 (AADN00000000), программы SPAdes 3.11, классификаторы систематической принадлежности нуклеотидных последовательностей Kraken и Kaiju. Для создания баз данных были использованы куриные, бактериальные и вирусные геномные последовательности, представленные в NCBI. Бактериальные и вирусные последовательности использовались для формирования стандартных баз данных Kraken и Kaiju. Последовательность galGal5 (AADN00000000) использовалась для создания базы данных для Kraken.

Биоинформационная обработка данных осуществлялась на рабочей станции HP Z800 Workstation с установленной системой Ubuntu 16.04 LTS, процессор Intel® Xeon(R) CPU X5675 @ 3.07GHz × 24, оперативная память 96 Гб (12 × 8 Гб). Для фильтрации ридов разработан авторский скрипт echidna.py (доступен по запросу).

Результаты и обсуждение

Результаты массивированного параллельного секвенирования были проанализированы с использованием программ Kraken и Kaiju. Обе программы предназначены для определения принадлежности нуклеотидных последовательностей к определенной таксономической группе и относятся к наиболее распространенным и эффективным классификаторам. Однако алгоритмы анализа, реализованные в данных программах, существенно различаются. Программа Kraken осуществляет идентификацию имеющихся ридов на основании базы данных, состоящей из коротких последовательностей длиной в 31 нуклеотид (k-mer). Для каждого k-mer определена систематическая принадлежность. В зависимости от встречаемости k-mer среди живых организмов возможна идентификация вплоть до вида. В программе Kaiju для проведения идентификации осуществляется перевод из

нуклеотидной в аминокислотную последовательность кодируемых белков. Дальнейшая идентификация филогенетической принадлежности ридов осуществляется на уровне аминокислотных последовательностей.

Нами был проведен анализ имеющихся архивов данных с использованием программ Kaiju (рис. 1) и Kraken (рис. 2). Для создания базы данных для программы Kaiju были использованы геномные последовательности микробов и вирусов. Референсная база данных для Kraken включала геномные последовательности *Gallus gallus*, микробы и вирусы.

При использовании программы Kraken удалось провести классификацию 2 376 938 ридов из архивов сырых данных. В то же время программа Kaiju позволила классифицировать 1 829 934 сырых ридов. По результатам биоинформационного анализа архива ридов с использованием программы Kaiju установлено, что к роду *Chlamydia* относятся 138 581 ридов (8%). При использовании программы Kraken установлено, что к этому роду принадлежит 52 479 идентифицированных ридов (4%). Вероятно, программа Kaiju позволила провести идентификацию филогенетической принадлежности большего количества ридов из исходных архивов, поскольку алгоритм, используемый Kaiju, менее чувствителен к экспериментальным ошибкам, а также позволяет идентифицировать филогенетически удаленные штаммы бактерий, имеющие мутации в геномах. Однако программа Kaiju не позволяет эффективно проводить анализ последовательностей, которые не кодируют белковые молекулы.

Затем нами был проведен анализ имеющихся архивов ридов с использованием программы Kraken и базы данных, сгенерированной при анализе куриного генома *Gallus gallus* GCF_000002315.4. В результате 2 282 025 ридов из 2 376 938 (96%) (рис. 3) были идентифицированы как последовательности, относящиеся к куриному геному. Этот результат плохо согласуется с данными, полученными при использовании базы микробных последовательностей, поскольку при ее использовании 922 564 ридов (39%) были



Рис. 1. Результат классификации исходных ридов с использованием программы Kaiju и базы данных, сформированной на основании геномных последовательностей бактерий и вирусов.

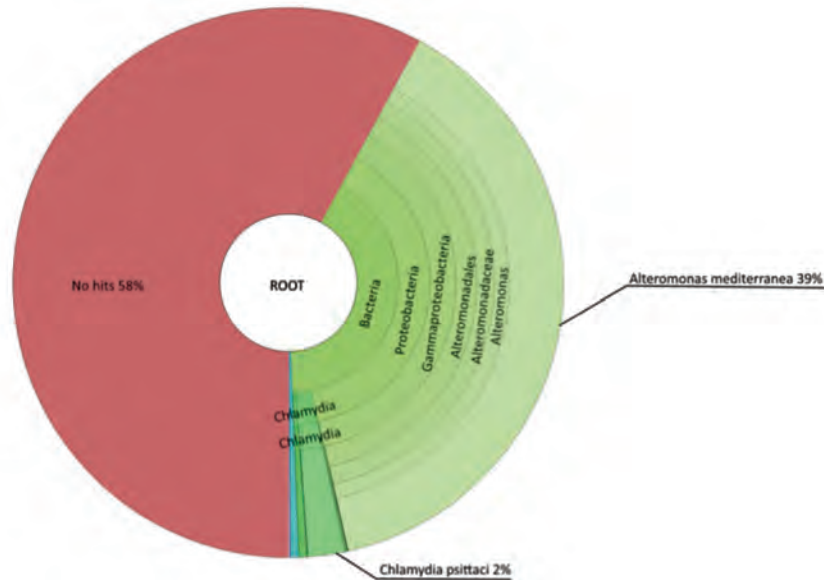


Рис. 2. Результат классификации исходных ридов с использованием программы Kraken и базы данных, сформированной на основании геномных последовательностей бактерий и вирусов.

идентифицированы как принадлежащие к *Alteromonas mediterranea*.

Поскольку анализируемые архивы ридов были получены при изучении штамма хламидии, выделенного на территории Российской Федерации, в то время как другие штаммы *Chlamydia psittaci*, для которых имеются публично доступные данные, выделены за рубежом, дальнейшие исследования будут направлены на изучение его уникальных особенностей. Наиболее эффективным алгоритмом для изучения уникальных особенностей генома является сборка *de novo*. В результате анализа установлено что при использовании исходного архива ридов количество собранных контигов составило 104 651, а их суммарная длина – 46 063 704 основания.

Поскольку размер генома *Chlamydia psittaci* не превышает 1 200 000 оснований, то очевидно, что доля бактериальных геномных последовательностей в суммарной длине сборки не превышает 3% (табл. 1). Все остальные последовательности относятся к куриному геному. Это значительно усложняет анализ данных, полученных при анализе подобного образца.

Для увеличения эффективности сборки был применен алгоритм фильтрации данных, направленный на удаление нуклеотидных последовательностей куриного эмбриона. Для этих целей была использована программа bowtie2 (версия 2.2.4). В качестве референсного генома использовался

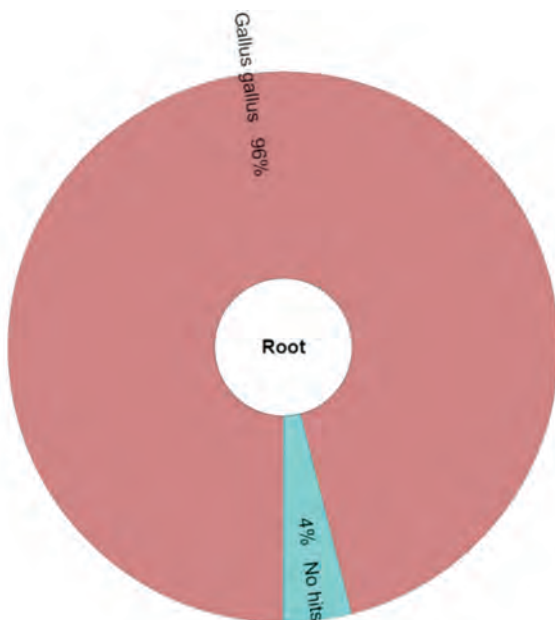


Рис. 3. Результат классификации исходных ридов с использованием программы Kraken и базы данных, сформированной на основании геномных последовательностей курицы.

Таблица 1. Анализ результатов сборки исходного архива ридов

Название сборки	Количество контигов	Суммарная длина контигов	Размер наибольшего контига	GC, %	N50
K21	5 491 424	382 061 537	1424	42,46	564
K33	4 009 634	415 284 853	1834	42,62	571
K55	132 699	45 557 932	113 266	44,01	677
K77	153 794	58 019 250	198 364	43,35	622
K99	175 907	70 003 541	144 453	43,64	599
K127	104 651	46 066 934	198 364	43,69	600
Конечная сборка	104 651	46 063 704	198 364	43,69	600

Таблица 2. Результаты сборки данных полногеномного секвенирования по алгоритму *de novo* после фильтрации bowtie2

Название сборки	Количество контигов	Суммарная длина контигов	Размер наибольшего контига	GC, %	N50
K91	659	1 375 105	18 479	40,59	4223
K95	622	1 368 492	18 479	40,65	4487
K99	776	1 430 529	26 965	40,58	4852
K103	873	1 446 411	26 965	40,56	5039
K107	602	1 368 742	18 479	40,59	4685
K111	608	1 368 285	18 153	40,54	4852
K115	573	1 357 188	18 153	40,54	5039
K119	611	1 377 308	26 965	40,48	5113
K123	568	1 364 600	26 965	40,45	5113
K127	516	1 339 092	18 153	40,47	5597

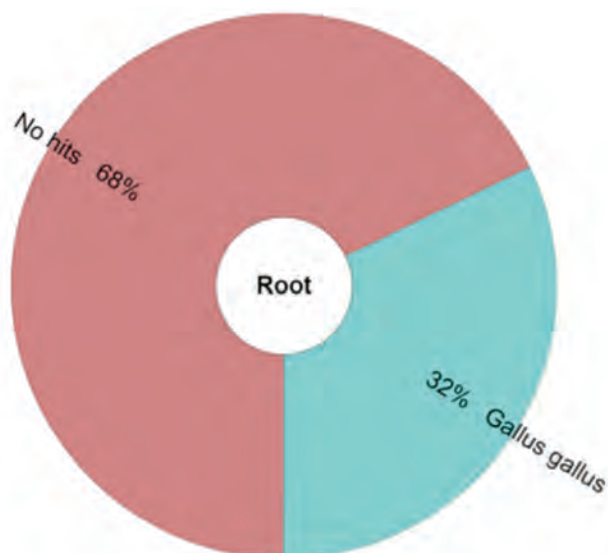


Рис. 4. Анализ сборки K127 с использованием программы Kraken (база данных для последовательностей куриного эмбриона).

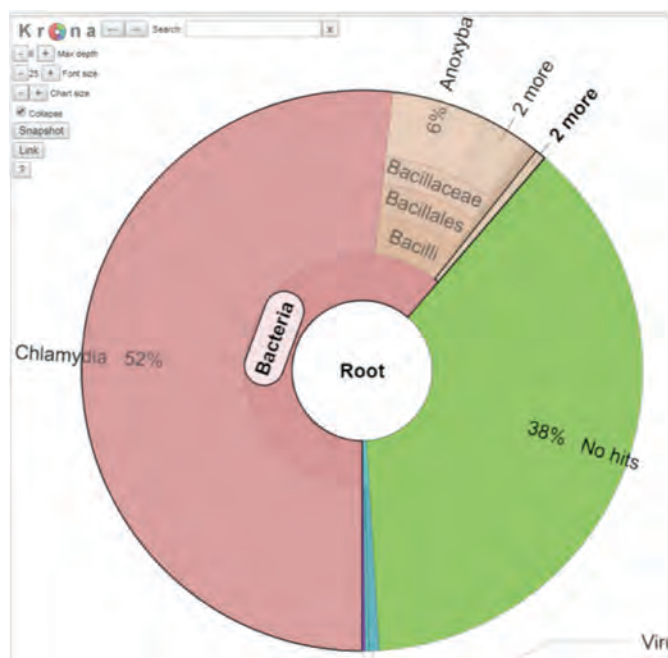


Рис. 5. Анализ сборки K127 с использованием программы Kraken (база данных для последовательностей геномов и вирусов).

Таблица 3. Результаты сборки данных полногеномного секвенирования по алгоритму *de novo* после фильтрации архива ридов в программе Kraken

Название сборки	Количество контигов	Суммарная длина контигов	Размер наибольшего контига	GC, %	N50
K21	11 728	3 375 984	61 317	39,69	11 025
K33	7227	3 108 882	127 311	39,82	26 917
K55	5080	2 861 962	129 891	39,76	36 787
K77	4207	2 746 263	228 822	39,55	91 037
K99	3534	2 584 596	228 822	39,63	70 278
K127	2350	2 196 256	228 822	39,67	70 278
Конечная сборка	2350	2 196 225	228 822	39,67	70 278

galGal5. Для последующей сборки использовались риды, для которых не удалось осуществить картирование на референсный геном.

В результате реконструкции генома хламидии по алгоритму *de novo* полученные риды удалось собрать менее чем в 1000 контигов (табл. 2). При этом суммарная длина контигов составляла 1 300 000–1 446 411 оснований, что несколько превышало размеры геномов известных штаммов *Chlamydia psittaci* [4]. При этом максимальная длина контига не превышала 26 965 оснований.

Поскольку суммарная длина контигов существенно превышала размер генома *Chlamydia psittaci*, нами было решено провести проверку полученных сборок на наличие последовательностей, принадлежащих геному куриного эмбриона. Пример анализа сборки K127 с использованием программы Kraken показан на рисунке 4.

При этом из 516 полученных контигов последовательностями, принадлежащими к геномам различных микроорганизмов, были идентифицированы 316 (62%) (рис. 5). К контигам, не принадлежащим какому-либо микроорганизму, было причислено 195 (38%). При использовании базы данных для генома курицы 166 контигов были идентифицированы (32%) как принадлежащие геному куриного эмбриона.

Полученные контиги были проанализированы с использованием программы Blast. Для некоторых из них была выявлена химерная структура реконструированной последовательности, при которой одна часть контига оказывалась гомологичной нуклеотидным последовательностям куриного эмбриона, а другая – геному хламидии (данные не приведены).

Поскольку алгоритм фильтрации, основанный на картировании на референсный геном, оказался малоэффективным, нами были проанализированы возможности технологий обработки информации, применяемых в метагеномных исследованиях для повышения эффективности анализа изучаемого генома хламидии. Сотрудниками отдела коллекционных культур ФБУН ГНЦ ПМБ был разработан скрипт, позволяющий осуществлять фильтрацию ридов на основании данных, генерируемых программой Kraken. Алгоритм работы скрипта позволяет удалять из архива ридов данные, классифицированные по принадлежности к какой-либо таксономической группе. Подобный подход позволил удалить из имеющегося архива все риды, обладающие частичной гомологией с геномом куриного эмбриона. В результате использования данного подхода нами был сгенерирован набор из 94 913 ридов. Полученные риды были использованы для сборки геномов по алгоритму *de novo* с использованием программы SPAdes (табл. 3). При этом длина наибольшего контига составила 228 822 оснований, что в 8,5 раза превосходит максимальную длину контигов, полученных с использованием фильтрации на референсный геном. Таким образом, в результате разработанного алгоритма фильтрации ридов нам удалось реконструировать в непрерывную протяженную область более 20% хромосомы *Chlamydia psittaci*.

Нуклеотидные последовательности, не отнесенные на основании анализа метагеномного классификатора Kraken к последовательностям *Gallus gallus*, были собраны с использованием программы SPAdes. Всего было получено 2350 контигов, общая длина сборки составила 2 196 225 оснований, размер самого протяженного контига – 228 822 основания.

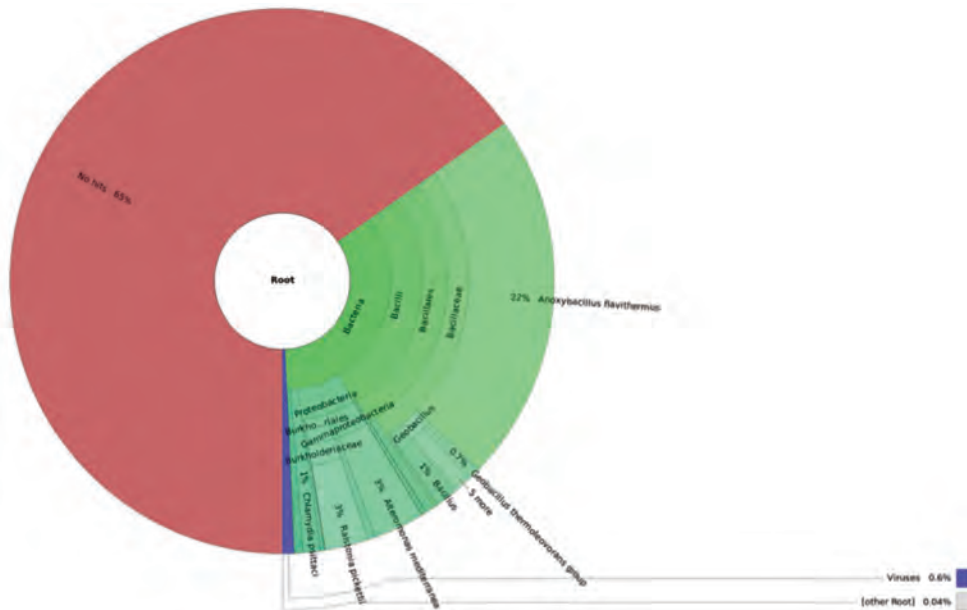


Рис. 6. Анализ сборки архива ридов после фильтрации с использованием программы Kraken (база данных для последовательностей геномов и вирусов).

Мы проанализировали полученную сборку с использованием классификатора Kraken. Результат анализа сборки представлен на рисунке 6.

При анализе полученных данных нами было обнаружено, что в исходном архиве ридов классификатор Kraken детектирует наличие 39% ридов, специфичных для *Alteromonas mediterranea*. При этом при использовании базы последовательностей, сформированной на основании анализа генома *Gallus gallus*, количество ридов, идентифицированных как риды куриного генома, составляет 96%. Очевидно, что подобное несоответствие связано с ошибками классификации. Вероятно, в базе данных, предназначенных для идентификации нуклеотидных последовательностей бактерий и вирусов, оказались последовательности, гомологичные с геномом клеток куриного эмбриона. При этом в зависимости от используемой базы часть ридов оказывалась идентифицированной либо как принадлежащие к геному курицы, либо как принадлежащие к геному *Alteromonas mediterranea*. С другой стороны, существует возможность, что при создании референсного генома *Gallus gallus* образцы ДНК оказались контаминированными микроорганизмами, обладающими высокой гомологией с геномом *Alteromonas mediterranea*.

Для определения причин, связанных с проблемами идентификации большого числа ридов из изучаемых архивов, мы провели анализ теоретически ожидаемой величины покрытия при реконструкции генома *Alteromonas mediterranea*. Поскольку геном данной бактерии составляет приблизительно 4 480 937 оснований, кратность покрытия при сборке 918 143 ридов длиной 220 оснований каждый должна составить более 45. Однако при анализе сборок, полученных при использовании алгоритма *de novo*, нам не удалось обнаружить ни одного контига с подобной кратностью покрытия. Более того, в итоговых сборках вообще не удалось обнаружить контиги, принадлежащие к *Alteromonas mediterranea*. При этом обычное покрытие контигов, относящихся к геному *Chlamydia psittaci* по данным SPAdes, имело кратность по-

крытия порядка 4–6 (рис. 7). Эти данные позволяют прийти к заключению, что в исходном архиве риды, принадлежащие к геному куриного эмбриона, были ошибочно классифицированы как риды, принадлежащие к *Alteromonas mediterranea*.

Дополнительно нами был проведен анализ кратности покрытия контигов, отнесенных к классу *Bacilli*. Для обнаруженных контигов кратность покрытия составляла порядка 1. Для части ридов нами был проведен анализ в программе Blast. Например, контиг NODE_20 из сборки отнесен к бациллам, однако при анализе Blast нами было обнаружено, что нуклеотидные последовательности контига в позициях 1–76 обладают высокой гомологией с геномом карпа

```

NODE_1_length_228822_cov_6.275358
NODE_2_length_144502_cov_6.299567
NODE_3_length_138117_cov_5.646496
NODE_4_length_106804_cov_5.304030
NODE_5_length_91794_cov_5.407071
NODE_6_length_70278_cov_5.878020
NODE_7_length_65701_cov_5.432748
NODE_8_length_62050_cov_6.109039
NODE_9_length_51227_cov_5.804932
NODE_10_length_41308_cov_5.979481
NODE_11_length_30318_cov_5.221026
NODE_12_length_25991_cov_5.472394
NODE_13_length_23514_cov_5.415060
NODE_14_length_17095_cov_5.377004
NODE_15_length_13616_cov_5.731485
NODE_16_length_12522_cov_5.453489
NODE_17_length_12045_cov_5.193908
NODE_18_length_7679_cov_20.016022
NODE_19_length_7413_cov_5.751853
NODE_22_length_2814_cov_6.045404
NODE_24_length_2751_cov_6.415015
NODE_26_length_1908_cov_6.211679
NODE_30_length_1450_cov_4.557823
NODE_31_length_1437_cov_6.039695
    
```

Рис. 7. Анализ контигов, полученных при асемблировании архивов ридов с элиминированными последовательностями *Gallus gallus*. Красным выделен контиг, принадлежащий плазмиде.

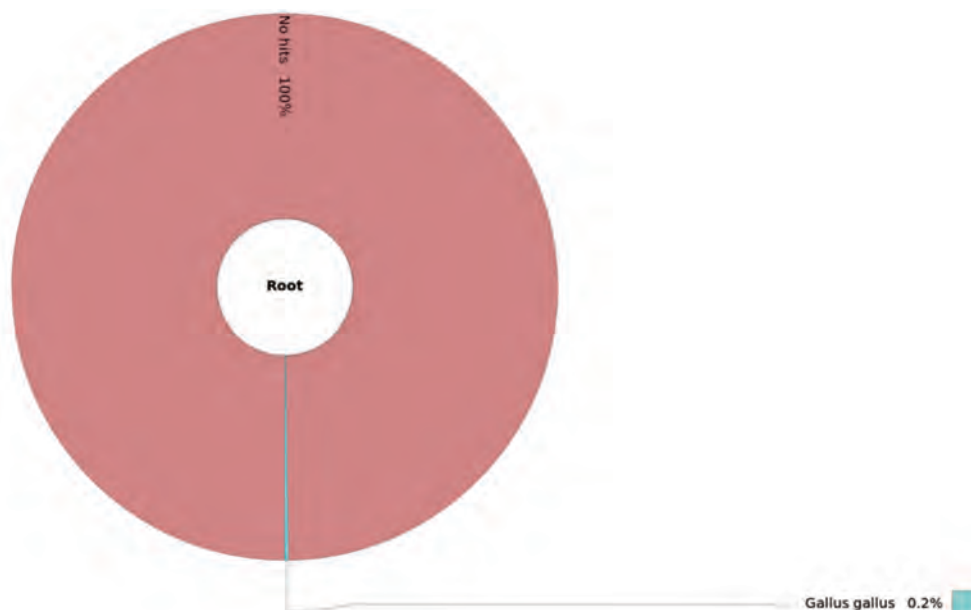


Рис. 8. Результат идентификации последовательностей, гомологичных геному *Gallus gallus* в сборках, сформированных из фильтрованных ридов.

Таблица 4. Результаты сборки, полученной из архива ридов, отобранных на принадлежность к роду хламидии

Название сборки	Количество контигов	Суммарная длина контигов	Размер наибольшего контига	GC, %	N50
K21	3820	1 226 116	10 531	38,95	2782
K33	1002	1 176 830	23 992	38,98	6740
K55	473	1 168 794	30 319	39,02	11 628
K77	76	1 140 588	125 854	39,01	59 694
K99	53	1 140 716	125 888	39,02	61 208
K127	37	1 138 357	125 888	39,02	61 236
Конечная сборка	37	1 138 357	125 888	39,02	61 236

Cyprinus carpio, а с 88 до конца контига – высокой гомологией с *Anoxybacillus flavithermus*.

Дополнительно мы провели анализ сборки, полученной после фильтрации ридов с использованием разработанного нами алгоритма, на наличие последовательностей, гомологичных геному клеток куриного эмбриона. При этом было обнаружено присутствие пяти контигов, содержащих последовательности, гомологичные *Gallus gallus* последовательностям, что составило 0,2% от суммарного числа контигов (рис. 8).

Вероятно, это связано с алгоритмом анализа, используемым Kraken. В тех случаях, когда исходные риды содержали последовательности, гомологичные геному курицы длиной меньше 31 нуклеотида, эффективность фильтрации может оказаться недостаточной для их элиминирования в сортируемом архиве. При этом в результате сборки подобные риды могли быть реконструированы в последовательности, содержащие гомологичные участки длиннее, чем используемый k-mer.

Также мы использовали разработанный скрипт для извлечения из исходного архива 49 909 ридов, принадлежащих к *Chlamydia psittaci*. Полученные риды были собраны в контиги с помощью SPAdes. Всего было сгенерировано 37 контигов, суммарная длина сборки составила 1 138 357. Размер самого длинного контига составил 125 888 основа-

ний (табл. 4). Размеры геномов референсных штаммов хламидий варьируют от 1 140 789 до 1 172 064 оснований [4]. Таким образом, можно прийти к заключению, что нам удалось реконструировать от 99,8% до 97,1% генома изучаемого штамма *Chlamydia psittaci*.

Заключение

В результате проведенных исследований был разработан подход, основанный на использовании алгоритмов метагеномных исследований для обработки данных полногеномного секвенирования образца, содержащего смесь нуклеиновых кислот, принадлежащих клеткам куриного эмбриона и *Chlamydia psittaci*, а также изучена его эффективность. Несмотря на большую эволюционную дистанцию между данными организмами, а также низкую гомологию в последовательностях нуклеиновых кислот, показана возможность образования как химерных ридов, так и химерных контигов при проведении подобных исследований.

Разработанный алгоритм и программное обеспечение для фильтрации полученных данных могут быть легко адаптированы для исследований других микроорганизмов, при изучении которых возможно наличие контаминирующих нуклеиновых кислот.

Информация о финансировании

Исследование выполнено в рамках Государственного контракта № 8-Д от 18.07.2016 г (биоинформационная обработка данных) и при поддержке Российского научного фонда (проект № 17-16-01099) (пробоподготовка материала штамма *Chlamydia psittaci*, секвенирование образца).

Литература

1. Онищенко ГГ, Дятлов ИА, Светоч ЭА, Воложанцев НВ, Баннов ВА, Карцев НН, и др. Молекулярно-генетическая характеристика шига-токсинпродуцирующих *Escherichia coli*, выделенных при вспышке пищевой инфекции в Санкт-

- Петербург в 2013 году. Вестник РАМН. 2015;70(1):70-81. DOI: 10.15690/vramn.v70i1.1234
- Sizova OV, Shashkov AS, Kondakova AN, Knirel YA, Shaikhutdinova RZ, Ivanov SA, et al. Full structure and insight into the gene cluster of the O-specific polysaccharide of *Yersinia intermedia* H9-36/83 (O:17). Carbohydr Res. 2018 May 2;460:51-56. DOI: 10.1016/j.carres.2018.02.014. Epub 2018 Feb 28.
 - Перетрухина АТ, Блинова ЕИ. Бактерийные и вирусные препараты. Академия Естествознания, 2010 г. ISBN: 978-5-91327-156-3.
 - Van Lent S, Piet JR, Beecman D, van der Ende A, Van Nieuwerburgh F, Bavoil P, et al. Full genome sequences of all nine *Chlamydia psittaci* genotype reference strains. J Bacteriol. 2012 Dec;194(24):6930-1. DOI: 10.1128/JB.01828-12

References

- Onishchenko GG, Dyatlov IA, Svetoch EA, Volozhantsev NV, Bannov VA, Kartsev NN, et al. Molecular-genetic Characterization of Shiga-Toxin Producing *Escherichia Coli* Isolated During a Food-Borne Outbreak in St. Petersburg in 2013. Herald of the Russian Academy of Sciences. 2015;70(1):70-81. DOI: 10.15690/vramn.v70i1.1234 (In Russian).
- Sizova OV, Shashkov AS, Kondakova AN, Knirel YA, Shaikhutdinova RZ, Ivanov SA, et al. Full structure and insight into the gene cluster of the O-specific polysaccharide of *Yersinia intermedia* H9-36/83 (O:17). Carbohydr Res. 2018 May 2;460:51-56. DOI: 10.1016/j.carres.2018.02.014. Epub 2018 Feb 28.
- Peretrukhina AT, Blinova EI. Bakteriinye i virusnye preparaty. Akademiya Estestvoznaniya, 2010 g. ISBN: 978-5-91327-156-3. (In Russian).
- Van Lent S, Piet JR, Beecman D, van der Ende A, Van Nieuwerburgh F, Bavoil P, et al. Full genome sequences of all nine *Chlamydia psittaci* genotype reference strains. J Bacteriol. 2012 Dec;194(24):6930-1. DOI: 10.1128/JB.01828-12

Информация об авторах:

Федорова Валентина Анатольевна, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией, заместитель по НИР филиала ФГБУН «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», филиал в Саратове
Адрес: 410028, Саратов, ул. 53-й Стрелковой Дивизии, 6
E-mail: feodorovav@mail.ru

Кисличкина Ангелина Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0000
E-mail: kislichkina@obolensk.org

Сизова Анжелика Александровна, техник-программист отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0000
E-mail: sizova1508@gmail.com

Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 360003
E-mail: dyatlov@obolensk.org

Information about co-authors:

Valentina A. Fedorova, MD, PhD, DSc, professor, chief researcher, head of laboratory, deputy on research of the branch Federal Research Center of Virology and Microbiology, a branch in Saratov
Address: 6, 53 Rifle Division str., Saratov, 410028, Russian Federation
E-mail: feodorovav@mail.ru

Angelina A. Kislichkina, PhD (biol.), Senior Researcher of Microbial Collection Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0000
E-mail: kislichkina@obolensk.org

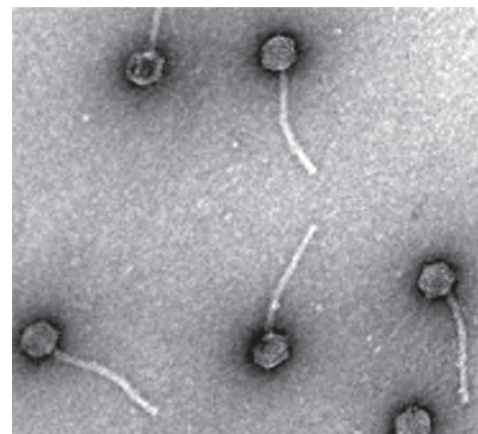
Angelica A. Sizova, software technician of Microbial Collection Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0000
E-mail: sizova1508@gmail.com

Ivan A. Dyatlov, Academician of RAS, Dr. Sci. (Med), Professor, Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: dyatlov@obolensk.org

НОВОСТИ НАУКИ

Фаги жизни – путь к фармации

Фаговая терапия в прошлом веке столкнулась как с энтузиазмом, так и скептицизмом. Новые антимикробные стратегии против летальных патогенов в настоящее время являются первоочередной задачей для ВОЗ, и хотя использование фагов в последнее время достигло значительных успехов, регулярное клиническое применение их вряд ли появится в ближайшем будущем. Столетие со дня открытия фагов – подходящее время для возрождения фаговой терапии, особенно по мере развития дилеммы устойчивости к антибиотикам. Фаги повсеместны в окружающей среде, в нашей пище и в наших телах. Их влияние на здоровье человека в настоящее время оценивается, и в обзоре представлены данные последних метагеномных исследований, которые предлагают роль фагов в структуре микробиома, а также в области здоровья и болезней. Оцениваются доказательства фагов как транспортных средств для переноса генов в контексте устойчивости к антибиотикам и обсуждаются проблемы и возможности по критическому пути от открытия фага к фармацевтическому вмешательству, ориентированному на пациента.



Forde A, Hill C.

Phages of life – the path to pharma.

Br J Pharmacol. 2018 Feb;175(3):412-418. DOI: 10.1111/bph.14106

Острые кишечные инфекции в Узбекистане. Динамика выявляемости основных сероваров сальмонелл и их резистентность к антибиотикам

Б.И.Алматов¹, Х.И.Исхакова², И.Х.Маматкулов³, А.О.Абдулаев², Л.Т.Ли¹

¹Центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора Республики Узбекистан, Ташкент, Республика Узбекистан;

²Ташкентский медицинский институт усовершенствования врачей, Ташкент, Республика Узбекистан;

³Научно-исследовательский институт эпидемиологии, микробиологии и инфекционных заболеваний Министерства здравоохранения Республики Узбекистан, Ташкент, Республика Узбекистан;

Проведен анализ частоты выделения нетифозных сальмонелл за 2008–2017 гг. при острых кишечных инфекциях (ОКИ) в Узбекистане. По среднереспубликанским показателям с 2012 г. удельный вес *S. enteritidis* постепенно возрастал и к концу наблюдения почти сравнялся с лидирующим ранее сероваром *S. typhimurium* (42,0% и 39,5%). По г. Ташкенту смена сероваров происходила более интенсивно: в 2012 г. регистрировали повышение частоты высеваемости *S. enteritidis* с 18% до 39%. К 2017 г. этот серовар стал доминирующим и высевался от больных с ОКИ в три раза чаще, чем *S. typhimurium* (60,5% и 19,2% соответственно). На ограниченном числе свежeweделенных штаммов *S. enteritidis* показано, что 80–100% штаммов *S. enteritidis* было чувствительно к цефтриаксон-сульбактаму, имипенему, меропенему, ципрофлоксацину, нетилмицину, доксициклину и хлорамфениколу. К эртапенему и азтреонаму более половины изученных изолятов были резистентны, что требует дальнейших специальных исследований.

Ключевые слова: острые кишечные инфекции, нетифозные сальмонеллы, смена сероваров, антибиотикорезистентность

Для цитирования: Алматов Б.И., Исхакова Х.И., Маматкулов И.Х., Абдулаев А.О., Ли Л.Т. Острые кишечные инфекции в Узбекистане. Динамика выявляемости основных сероваров сальмонелл и их резистентность к антибиотикам. Бактериология. 2018; 3(3): 14–18. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-14-18

Acute intestinal infections in Uzbekistan. Dynamics of detection of basic salmonella serotypes and their resistance to antibiotics

B.I.Almatov¹, Kh.I.Iskhakova², I.Kh.Mamatkulov³, A.O.Abdulaev², L.T.Li¹

¹Center for State Sanitary and Epidemiological Surveillance of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Republic of Uzbekistan;

²Tashkent Medical Institute of Advanced Medical Education, Tashkent, Republic of Uzbekistan;

³Research Institute of Epidemiology of Microbiology and Infectious Diseases of the Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Republic of Uzbekistan

The frequency of non-typhoid salmonella in 2008–2017 years has been analyzed in acute intestinal infections (AII) in Uzbekistan. According to the average national indicators, since 2012, the proportion of *S. enteritidis* gradually increased and by the end of the observation it was almost equal to the previously leading serovar *S. typhimurium* (42.0% and 39.5%). In Tashkent, the change of serovars occurred more intensively: in 2012 an increase in the frequency of seeding of *S. enteritidis* from 18% to 39% was recorded. By 2017 this serovar became dominant and was seeded from patients with acute intestinal infections three times more often than *S. typhimurium* (60.5% and 19.2%, respectively). On a limited number of newly isolated strains of *S. enteritidis*, it was shown that 80–100% of *S. enteritidis* strains were sensitive to ceftriaxone-sulbactam, imipenem, meropenem, ciprofloxacin, netilmicin, doxycycline and chloramphenicol. More than half of the isolates studied were resistant to ertapenem and aztreonam, which requires further special studies.

Keywords: acute intestinal infections, non-typhoid salmonella, change of serovars, antibiotic resistance

For citation: Almatov B.I., Iskhakova Kh.I., Mamatkulov I.Kh., Abdulaev A.O., Li L.T. Acute intestinal infections in Uzbekistan. Dynamics of detection of basic salmonella serotypes and their resistance to antibiotics. Bacteriology. 2018; 3(3): 14–18. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-14-18

Для корреспонденции:

Алматов Бахром Ибрагимович, главный врач Республиканского центра государственного санитарно-эпидемиологического надзора Министерства здравоохранения Республики Узбекистан

Адрес: 700097, Республика Узбекистан, Ташкент, ул. Дружбы народов, 56
Телефон: (0371) 276-5928
E-mail: bahrom.almatov@mizdrav.uz

Статья поступила 24.06.2018 г., принята к печати 29.10.2018 г.

For correspondence:

Bakhrom I. Almatov, chief physician of the Center for State Sanitary and Epidemiological Surveillance of the Republic of Uzbekistan

Address: 56 Druzhby Narodov str., Tashkent, 700097, Republic of Uzbekistan
Phone: (0371) 276-5928
E-mail: bahrom.almatov@mizdrav.uz

The article was received 24.06.2018, accepted for publication 29.10.2018

Острые кишечные инфекции (ОКИ) представляют собой одну из важнейших проблем в инфекционной патологии человека во всем мире [1–5]. Каждый год регистрируется более полумиллиона детей, заболевших ОКИ, при этом более чем в половине случаев этиология остается нерасшифрованной. Это затрудняет выбор препаратов для лечения ОКИ и создает сложности в проведении профилактики и противоэпидемических мероприятий.

В этиологии ОКИ существенную роль играют нетифозные сальмонеллы [6–8]. В течение продолжительного времени главным патогеном среди сальмонелл был серовар *S. typhimurium*, вызывавший преимущественно у детей госпитальные инфекции и ОКИ. Но к настоящему времени лидирующим сероваром в большинстве стран мира выступает *S. enteritidis* [6, 9–12]. Так, по данным Galanis E. и соавт., уже в 2006 г. в некоторых странах Европы *S. enteritidis* составлял 80,0% от всех выявляемых сальмонелл. В Азии, Латинской Америке и Африке удельный вес этого серовара колебался от 38% до 26%. Сопоставление частоты высеваемости различных сероваров сальмонелл при ОКИ в Санкт-Петербурге и Узбекистане (Ташкент) было проведено за 2 года (2014–2015 гг.). Был отмечен высокий удельный вес *S. enteritidis* (80%) в Санкт-Петербурге в отличие от Ташкента, где различия между высеваемостью основных сероваров были незначительны [2].

Для адекватного лечения сальмонеллезов необходимо знание локальных данных по резистентности возбудителей к антибиотикам и вероятности формирования механизмов устойчивости к современным антибактериальным препаратам [13, 14]. Особую роль имеет оценка резистентности сальмонелл к препаратам 1-й линии – фторхинолонам, цефалоспорином 2–3-го поколений, а также к карбапенемам как препаратам резерва [5, 7, 12, 15–18].

Цель исследования: определить соотношение основных сероваров сальмонелл как возбудителей ОКИ в Узбекистане за 10-летний период (2008–2017 гг.) и представить антибиотикорезистентность штаммов, выделенных в 2017 г.

Материалы и методы

За 10-летний период наблюдения (2008–2017 гг.) проведен ретроспективный анализ частоты выявляемости основных нетифозных сероваров сальмонелл при ОКИ в Узбекистане. Микробиологическая диагностика проводилась общепринятыми традиционными методами – прямой посев фекалий на плотные питательные среды (Эндо, висмут-сульфит, Плоскирева) и на накопительные жидкие среды

(тетратионатная среда Мюллер-Кауфмана и селенитовая или хлормагниевая). Выросшие подозрительные колонии засеивались на комбинированную среду Клиггера с дальнейшим изучением биохимических свойств и антигенной структуры согласно Международному руководству Bergey's [19]. У 40 штаммов *S. enteritidis*, выделенных в 2017 г., была подтверждена принадлежность к роду *Salmonella* методом масс-спектрометрии (MALDI-TOF) на аппарате VITEK® MS IVD V3 (bioMérieux, France). У тех же изолятов была изучена антибиотикорезистентность диско-диффузионным методом (ДДМ); выполнение методики и оценку зон задержки роста (ДЗЗР) микроорганизмов вели в соответствии с рекомендациями EUCAST [20].

Результаты исследования

За анализируемый 10-летний период в республике было выделено 12 190 штаммов нетифозных сальмонелл. Доминирующими были два серовара – *S. typhimurium* – 8460 (69,4%) и *S. enteritidis* – 2108 (17,3%). К сероварам других групп относились 1622 штамма (13,3%). Частота обнаружения каждой из указанных групп сероваров в разные годы представлена в таблице.

Из представленных данных следует, что на протяжении 2008–2011 гг. доминировали *S. typhimurium*, которые выявлялись от больных ОКИ в 79,0–82,5% случаев. Высеваемость *S. enteritidis* не превышала 9,7%. В 2012 г. обнаружение этого серовара возросло в 2 раза, в последующие годы шел постепенный рост этого показателя и к 2017 г. он почти сравнялся с высеваемостью *S. typhimurium* (42,0% и 39,5% соответственно). Данные по г. Ташкенту существенно отличались от среднереспубликанских показателей. Так, за весь период наблюдения другие серовары сальмонелл в столице обнаруживались почти в два раза реже (443 штамма, или 7,6%), а показатель высеваемости *S. enteritidis* был выше, чем в среднем по республике, в 1,6 раза (1678 штаммов, 28,6%). Наиболее демонстративным было возрастание этиологической роли *S. enteritidis* при ОКИ в динамике наблюдения (рис. 1).

Как видно, резкое повышение частоты высеваемости *S. enteritidis* с 18% до 39% с соответствующим снижением *S. typhimurium* произошло в 2012 г. Уже в 2015 г. обнаружение *S. enteritidis* у больных ОКИ немного превышало обнаружение доминирующего ранее возбудителя, а в 2017 г. зарегистрирована существенная разница (*p*) в частоте их выявления с лидирующей ролью *S. enteritidis* (60,5% и 19,2% соответственно). Таким образом, в Узбекистане смена серо-

Таблица. Динамика выявляемости сальмонелл при ОКИ в Республике Узбекистан

№	Год исследования	Всего нетифозных сальмонелл	<i>S. typhimurium</i>		<i>S. enteritidis</i>		Другие серовары	
			абс.	%	абс.	%	абс.	%
1	2008	1994	1579	79,2	181	9,1	234	11,7
2	2009	1632	1348	82,6	152	9,3	132	8
3	2010	1534	1258	82	168	10,5	108	7
4	2011	1134	935	82,5	110	9,7	89	7,8
5	2012	992	700	70,5	98	20	94	9,4
6	2013	1052	705	67	195	18,5	152	14,4
7	2014	1164	704	60,5	211	18,1	249	21,4
8	2015	791	377	47,7	192	24,3	222	28
9	2016	937	451	48,1	321	34,3	165	17,6
10	2017	960	403	41,9	380	39,5	177	18,4

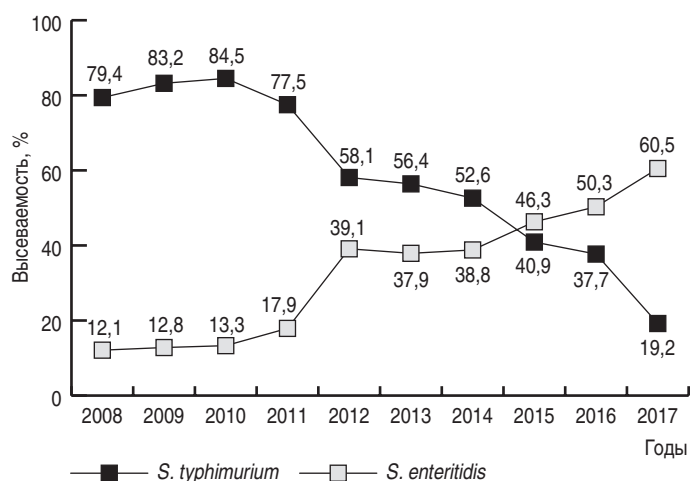


Рис. 1. Удельный вес высеваемости при ОКИ двух основных сероваров сальмонелл за период 2008–2017 гг. по г. Ташкенту.

варов сальмонелл происходит намного медленнее, чем во многих других странах мира, и только в последние несколько лет.

До 2014 г. по группе «другие серовары» расшифровка антигенной структуры нетифозных салмонелл выявила их большое разнообразие без доминирования каких-либо сероваров. В 2014 г. внутри этой группы возросла высеваемость *S. infantis* – 80 изолятов (32,1%). Этот же серовар лидировал в 2015 г. (44 – 19,8%), второе место занял серовар *S. Virchow* (21 – 9,4%). В последующие годы в группе «других» удельный вес *S. infantis* снизился до 8,4–9,0%; *S. Virchow* в 2016 г. высевался в 17,5%, в 2017 г. – в 5%.

Исследование резистентности к антибиотикам было проведено на ограниченном количестве штаммов, выделенных в 2017 г. (рис. 2).

Изученные штаммы *S. enteritidis* резистентны к ампициллин-сульбактаму и цефуросиму в 100% случаев, в то время как к другим цефалоспорином (ЦП) 2–3-го поколений многие штаммы были чувствительны (65–85%), кроме цефепима, к которому более половины изолятов были умеренно-резис-

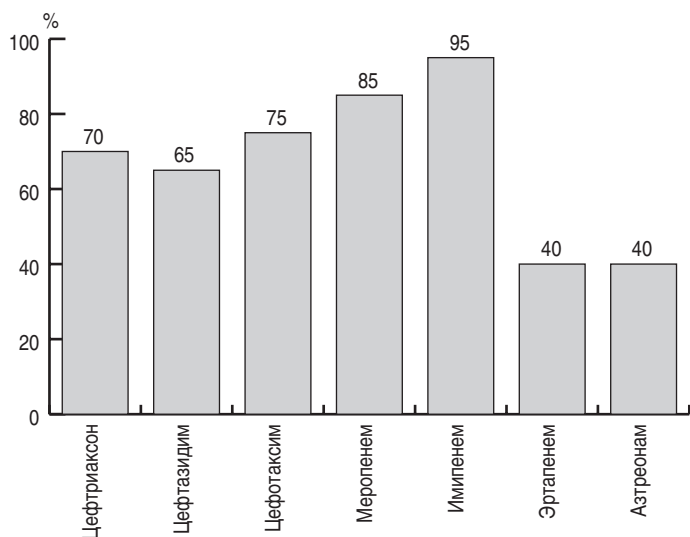


Рис. 2. *S. enteritidis*, чувствительные к β-лактамам антибиотикам.

тентными. Самая высокая активность среди ЦП 3-го поколения отмечена у ингибиторзащищенного ЦП – цефтриаксон-сульбактама (85%). Штаммы, резистентные хотя бы к одному из 3 базовых ЦП 3-го поколения (цефтриаксон, цефотаксим и цефтазидим), предположительно относятся к продуцентам β-лактамаз расширенного спектра – БЛРС [20], по нашим данным, вероятными продуцентами БЛРС были от 25 до 35% штаммов *S. enteritidis*.

Особый интерес представляют данные по карбапенемам. Почти все изоляты оказались чувствительны к имипенему (95%) и меропенему (85%). Иные результаты получены в отношении эртапенема, который был эффективен менее чем у половины штаммов *S. enteritidis* (40%). Остальные были нечувствительны (25%) или имели промежуточную устойчивость (35%). Близкие к этим данные были получены и в отношении азтреонама (40% чувствительны, 45% устойчивы и 15% умеренноустойчивы). Ранее нами уже была описана необычная устойчивость внутрибольничных уропатогенных эшерихий к эртапенему [21], хотя этот карбапенем в нашем регионе не зарегистрирован и практически не используется, согласно EUCAST [20] подобные штаммы относятся к «исключительным» фенотипам и должны быть подтверждены в референс-центре. Есть вероятность, что это региональная особенность местных штаммов, требующая дальнейших исследований – как в плане существенного увеличения количества изучаемых изолятов и их видов/сероваров, так и в плане определения механизмов устойчивости современными фено- и генотипическими методами.

В отличие от ряда публикаций [10, 18, 22] наши результаты показали, что фторхинолоны были эффективны в отношении местных штаммов *S. enteritidis* – в 100% к ципрофлоксацину, в 80–70% к левофлоксацину, офлоксацину и пефлоксацину (рис. 3).

Среди аминогликозидов наиболее активным оказался нетилмицин, к нему было чувствительно 95% изолятов. К другим аминогликозидам чувствительность *S. enteritidis* была ниже не только у гентамицина (65%), но и у амикацина (70%) за счет умеренно резистентных штаммов. Чувстви-

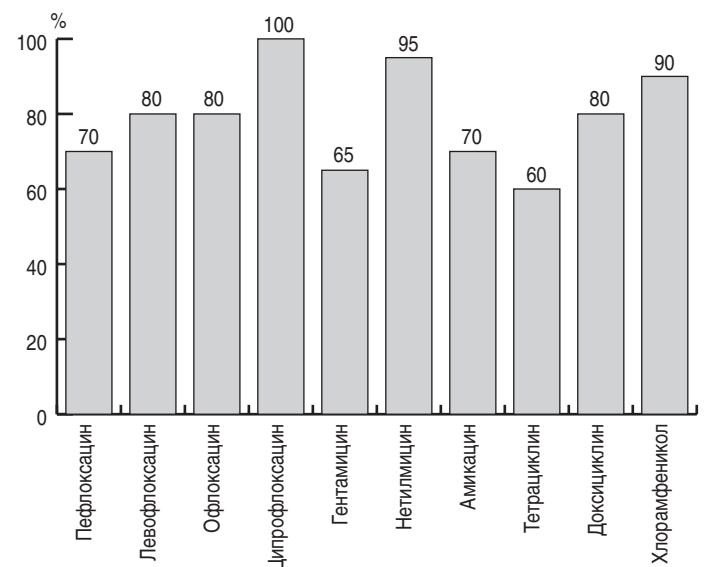


Рис. 3. *S. enteritidis*, чувствительные к антибиотикам разных групп.

тельность сальмонелл к «старым», широко использовавшимся ранее доксициклину и хлорамфениколу была высокой и сопоставимой только с цiproфлоксацином, имипенемом и меропенемом (по 100–90%). Тигециклин (США, Пфайзер) относится к сравнительно новым антибиотикам, по химической структуре входит в группу глицилциклинов и считается одним из самых активных антибиотиков, обладающим расширенным спектром антибактериальной активности [23]. Из изученных нами изолятов *S. enteritidis* чувствительными к нему было 80% штаммов, остальные были умеренно резистентными.

Выводы

1. Наблюдение за многолетней динамикой (2008–2017 гг.) выявляемости нетифозных сальмонелл при ОКИ в Узбекистане показало постепенное возрастание этиологической роли серовара *S. enteritidis* в сравнении с *S. typhimurium*. В столице республики Ташкенте *S. enteritidis* стал ведущим сероваром в 2016–2017 гг. (50,3–60,5%).

2. Большинство штаммов (100–80%) *S. enteritidis* было чувствительно к цефтриаксон-сульбактаму, имипенему, меропенему, цiproфлоксацину, нетромицину, доксициклину и хлорамфениколу. К эртапенему и азтреонаму чувствительно было лишь 40,0% изученных штаммов *S. enteritidis*, что нуждается в дальнейшем детальном изучении.

Литература

- Абдухалилова ГК, Умарова АА Этиологическая структура острых кишечных инфекций, определенная бактериологическим и молекулярно-генетическим методами. Медицинский журнал Узбекистана. 2013;3:73-75.
- Кафтырева ЛА, Егорова СА, Абдухалилова ГК, Бектимиров АМ, Ахмедов ИФ. Сравнительный анализ чувствительности к антибиотикам штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге и Ташкенте в 2014–2015 гг. Материалы и национального конгресса бактериологов. Инфекция и иммунитет. 2016;6(3):40-41.
- Соколова ЕД, Галтаева АМ, Замурий ОЮ, Дидиченко ОВ, Соколова ЮВ, Муратова ВА, и др. Полимеразная цепная реакция в диагностике острых кишечных инфекций в детском инфекционном стационаре: возможности и проблемы. Инфекция и иммунитет. 2016;6(3):225-31.
- GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect Dis*. 2017 Sep;17(9):909-948. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30276-1.
- Angelo KM, Reynolds J, Karp BE, Hoekstra RM, Scheel CM, Friedman C. Antimicrobial Resistance Among Nontyphoidal *Salmonella* Isolated From Blood in the United States, 2003–2013. *J Infect Dis*. 2016 Nov 15;214(10):1565-1570. DOI: 10.1093/infdis/jiw415
- Виткова ОА, Крутова ОН, Рожнова НЕ, Гусева СШ, Христюхина АН. Роль современных методов типирования в изучении генетического разнообразия и чувствительности к антибиотикам штаммов сальмонелл, выделенных из разных источников. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2017;3:15-24.
- Crump JA, Medalla FM, Joyce KW, Krueger AL, Hoekstra RM, Whichard JM, et al. Antimicrobial Resistance among Invasive Nontyphoidal *Salmonella* enteric Isolates in the United States: National Antimicrobial Resistance Monitoring System, 1996 to 2007. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Mar;55(3):1148-54. DOI: 10.1128/AAC.01333-10
- Galanis E1, Lo Fo Wong DM, Patrick ME, Binsztein N, Cieslik A, Chalermchikit T, et al. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000–2002. *Emerg Infect Dis*. 2006 Mar;12(3):381-8. DOI: 10.3201/eid1205.050854
- Шевченко СС, Грекова АИ, Шурмин ДА, Минаева АС, Смолянкин НН, Соломатина НН. Сальмонеллез у детей на современном этапе. Журнал инфектологии. Приложение. 2016;8(3):125.
- Fardsanei F, Soltan Dallal MM, Douraghi M, Memariani H, Bakhshi B, Zahraei Salehi T, Nikkhahi F. Antimicrobial resistance, virulence genes and genetic relatedness of *Salmonella* enteric serotype Enteritidis isolates recovered from human gastroenteritis in Tehran, Iran. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018 Mar;12:220-226. DOI: 10.1016/j.jgar.2017.10.005
- Wei ZQ, Chang HL, Li YF, Xu XB, Zeng M. Clinical epidemiology and antimicrobial resistance of nontyphoidal *Salmonella* enteric infections in children: 2012–2014. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2016 Jul;54(7):489-95. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2016.07.003
- Whistler T, Sapchookul P, McCormick DW, Sangwichian O, Jorakate P, Makprasert S, et al. Epidemiology and antimicrobial resistance of invasive nontyphoidal *Salmonellosis* in rural Thailand from 2006–2014. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 Aug 6;12(8):e0006718. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006718.
- Иванов АС. Современные представления об антибиотикорезистентности и антибактериальной терапии сальмонеллезов. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2009;11(4):305-26.
- Егорова СА, Макарова МА, Забровская АВ, Матвеева ЗН, Сужаева ЛВ, Войтенкова ЕВ, Кафтырева ЛА. Многообразие механизмов антибиотикорезистентности сальмонелл. Инфекция и иммунитет. 2011;1(4):303-10.
- Агеевец ВА, Лазарева ИВ, Сидоренко СВ. Проблема устойчивости к карбапенемным антибиотикам: распространение карбапенемаз в мире и России, эпидемиология, диагностика, возможности лечения. Фарматека. 2015; 14(307):9-16.
- Соловьева АС, Шубин ФН, Кузнецова НА. Антибиотикорезистентность штаммов *Salmonella enteritidis*, выделенных в Дальневосточном и Сибирском федеральном округах. Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2017;5(72): 15-21. DOI: 10.5281/zenodo.1115444
- Su LH, Wu TL, Chiu CH. Development of carbapenem resistance during therapy for non-typhoid *Salmonella* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Apr;18(4):E91-4. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03767.x.
- Tadesse G, Tessema TS, Beyene G, Aseffa A. Molecular epidemiology of fluoroquinolone resistant *Salmonella* in Africa: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2018 Feb 12;13(2):e0192575. DOI: 10.1371/journal.pone.0192575
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition (10), Volume Two, The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria. Don J. Brenner, Noel R. Krieg, James T. Staley EDITORS; George M. Garrity EDITOR-IN-CHIEF. 2001–2004
- Руководство EUCAST по определению механизмов антимикробной и специфической устойчивости, обладающих особым клиническим и/или эпидемиологическим значением. Редакция 1.0, декабрь 2015.
- Iskhakova KI, et al. Antibiotic resistance of hospital strains of Enterobacteriaceae and phenotypic methods for detecting beta-lactamases. *European Sciences review. Scientific journal*. 2016;11-12:58-60.
- Behl P, Gupta V, Sachdev A, Guglani V, Chander J. Patterns in antimicrobial susceptibility of *Salmonellae* isolated at a tertiary care hospital in northern India. *Indian J Med Res*. 2017 Jan;145(1):124-128. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR_862_14
- Цветков ДС, Проценко ДН. Применение тигециклина в стационарах Российской Федерации – первый опыт. Инфекция в хирургии. 2013;11(2):38-43.

References

- Abdukhaliyeva GK, Umarova AA Etiologicheskaya struktura ostrykh kishcheynykh infektsii, opredelennaya bakteriologicheskimi i molekulyarno-geneticheskimi metodami. *Meditsinskii zhurnal Uzbekistana*. 2013;3:73-75. (In Russian).

2. Kaftyreva LA, Egorova SA, Abdukhalilova GK, Bektimirov AM, Akhmedov IF. Sravnitel'nyi analiz chuvstvitel'nosti k antibiotikam shtammov Salmonella, vydelennykh v Sankt-Peterburge i Tashkente v 2014–2015 gg. Russian Journal of Infection and Immunity. 2016;6(3):40-1. (In Russian).
3. Sokolova ED, Galtaeva AM, Zamurei OU, Didichenko OV, Sokolova UV, Muratova VA, et al. Acute enteric infections polymerase chain reaction assay in pediatric practice: opportunities and challenges. Russian Journal of Infection and Immunity. 2016;6(3):225-31. (In Russian).
4. GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. Lancet Infect Dis. 2017 Sep; 17(9):909-948. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30276-1.
5. Angelo KM, Reynolds J, Karp BE, Hoekstra RM, Scheel CM, Friedman C. Antimicrobial Resistance Among Nontyphoidal Salmonella Isolated From Blood in the United States, 2003–2013. J Infect Dis. 2016 Nov 15;214(10):1565-1570. DOI: 10.1093/infdis/jiw415
6. Rozhnova SSH, Guseva AN, Khristyukhina OA, Vitkova ON, Krutova NE. Role of current typing methods in investigating the genetic diversity of Salmonella strains isolated from different sources and their antibiotic susceptibility. Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items. 2017;3:15-24. (In Russian).
7. Crump JA, Medalla FM, Joyce KW, Krueger AL, Hoekstra RM, Whichard JM, et al. Antimicrobial Resistance among Invasive Nontyphoidal Salmonella enteric Isolates in the United States: National Antimicrobial Resistance Monitoring System, 1996 to 2007. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Mar;55(3):1148-54. DOI: 10.1128/AAC.01333-10
8. Galanis E1, Lo Fo Wong DM, Patrick ME, Binsztein N, Cieslik A, Chalermchikit T, et al. Web-based surveillance and global Salmonella distribution, 2000-2002. Emerg Infect Dis. 2006 Mar;12(3):381-8. DOI: 10.3201/eid1205.050854
9. Shevchenko SS, Grekova AI, Shurmin DA, Minaeva AS, Smolyankin NN, Solomatina NN. Sal'monellez u detei na sovremennom etape. Journal Infectology. 2016;8(3):125. (In Russian).
10. Fardsanei F, Soltan Dallal MM, Douraghi M, Memariani H, Bakhshi B, Zahraei Salehi T, Nikkhahi F. Antimicrobial resistance, virulence genes and genetic relatedness of Salmonella enteric serotype Enteritidis isolates recovered from human gastroenteritis in Tehran, Iran. J Glob Antimicrob Resist. 2018 Mar;12:220-226. DOI: 10.1016/j.jgar.2017.10.005
11. Wei ZQ, Chang HL, Li YF, Xu XB, Zeng M. Clinical epidemiology and antimicrobial resistance of nontyphoidal Salmonella enteric infections in children: 2012-2014. Zhonghua Er Ke Za Zhi. 2016 Jul;54(7):489-95. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2016.07.003
12. Whistler T, Sapchookul P, McCormick DW, Sangwichian O, Jorakate P, Makprasert S, et al. Epidemiology and antimicrobial resistance of invasive nontyphoidal Salmonellosis in rural Thailand from 2006-2014. PLoS Negl Trop Dis. 2018 Aug 6;12(8):e0006718. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006718.
13. Ivanov AS. Antimicrobial Resistance and Therapy of Salmonella Infections. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2009;11(4):305-26. (In Russian).
14. Kaftyreva LA, Egorova SA, Makarova MA, Zbrovskaya AV, Matveeva ZN, Suzhaeva LV, Voitenkova EV. Diversity of antimicrobial resistance mechanisms in salmonella. Russian Journal of Infection and Immunity. 2011;1(4):303-10. (In Russian).
15. Ageevets VA, Lazareva IV, Sidorenko SV. Problema ustoychivosti k karbapenemnym antibiotikam: rasprostraneniye karbapenemaz v mire i Rossii, epidemiologiya, diagnostika, vozmozhnosti lecheniya. Pharmateca. 2015;14(307):9-16. (In Russian).
16. Solov'yeva AS, Shubin FN, Kuznetsova NA. Antibiotic resistance of Salmonella enteritidis sticks allocated in the far Eastern and Siberian federal districts. Health. Medical ecology. Science.. 2017;5(72):15-21. DOI: 10.5281/zenodo.1115444 (In Russian).
17. Su LH, Wu TL, Chiu CH. Development of carbapenem resistance during therapy for non-typhoid Salmonella infection. Clin Microbiol Infect. 2012 Apr;18(4):E91-4. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03767.x.
18. Tadesse G, Tessema TS, Beyene G, Aseffa A. Molecular epidemiology of fluoroquinolone resistant Salmonella in Africa: A systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2018 Feb 12;13(2):e0192575. DOI: 10.1371/journal.pone.0192575
19. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition (10), Volume Two, The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria. Don J.Brenner, Noel R. Krieg, James T. Staley EDITORS; George M. Garrity EDITOR-IN-CHIEF.2001-2004
20. EUCAST guidelines for the identification of antimicrobial and specific resistance mechanisms with particular clinical and/or epidemiological significance. Revision 1.0, December 2015. (In Russian).
21. Iskhakova KI, et al. Antibiotic resistance of hospital strains of Enterobacteriaceae and phenotypic methods for detecting beta-lactamases. European Sciences review. Scientific journal. 2016;11-12:58-60.
22. Behl P, Gupta V, Sachdev A, Guglani V, Chander J. Patterns in antimicrobial susceptibility of Salmonellae isolated at a tertiary care hospital in northern India. Indian J Med Res. 2017 Jan;145(1):124-128. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR_862_14
23. Tsvetkov DS, Protsenko DN. Primeneniye tigetsiklina v stacionarakh Rossiiskoi Federatsii – perviy opyt. Infektsii v khirurgii. 2013;11(2):38-43. (In Russian).

Информация об авторах:

Исхакова Халида Ильхамовна, доктор медицинских наук, профессор курса микробиологии Ташкентского института усовершенствования врачей
 Адрес: 100007, Республика Узбекистан, Ташкент, ул. Паркентская, 51
 Телефон: (998 90) 322-3174
 E-mail: sazonoval@mail.ru

Маматкулов Иброхим Хомидович, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник прикладного гранта НИИ эпидемиологии, микробиологии и инфекционных заболеваний Министерства здравоохранения Республики Узбекистан
 Адрес: 100133, Республика Узбекистан, Ташкент, ул. Заковат, 2
 Телефон: (998 97) 769-2899
 E-mail: bibinor@list.ru

Абдуллаев Асилбек Озодович, базовый докторант курса микробиологии Ташкентского института усовершенствования врачей Министерства здравоохранения Республики Узбекистан
 Адрес: 100007, Республика Узбекистан, Ташкент, ул. Паркентская, 51
 Телефон: (998 90) 931-0823
 E-mail: kurs.bak@mail.ru

Ли Лариса Тимофеевна, заведующая баклабораторией Республиканского центра государственного санитарно-эпидемиологического надзора Министерства здравоохранения Республики Узбекистан
 Адрес: 700097, Республика Узбекистан, Ташкент, ул. Дружбы народов, 56
 Телефон: (998 90) 905-1230
 E-mail: larisali@minzdrav.uz

Information about authors:

Khalida I. Iskhakova, MD, PhD, DSc, professor, leading researcher of applied grant, Research Institute of Epidemiology of Microbiology and Infectious Diseases of the Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan
 Address: 51 Parkentskaya str., Tashkent, 100007, Republic of Uzbekistan
 Phone: (998 90) 322-3174
 E-mail: sazonoval@mail.ru

Ibrokhir Kh. Mamatkulov, MD, PhD, DSc, professor, leading researcher of applied grant, Research Institute of Epidemiology of Microbiology and Infectious Diseases of the Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan
 Address: 2 Zakovat str., Tashkent, 100133, Republic of Uzbekistan
 Phone: (998 97) 769-2899
 E-mail: bibinor@list.ru

Asilbek O. Abdulaev, basic doctoral candidate of the microbiology course, Tashkent Institute of Advanced Medical Education of the Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan
 Address: 51 Parkentskaya str., Tashkent, 100007, Republic of Uzbekistan
 Phone: (998 90) 931-0823
 E-mail: kurs.bak@mail.ru

Larisa T. Li, head of bacteriological laboratory, Center of State Sanitary and Epidemiological Surveillance of the Republic of Uzbekistan
 Address: 56 Druzhby Narodov str., Tashkent, 700097, Republic of Uzbekistan
 Phone: (998 90) 905-1230
 E-mail: larisa.li@minzdrav.uz

Опыт применения иммунокорригирующей терапии при ВИЧ-инфекции

З.И.Бердиева^{1,3}, П.Е.Игнатов², И.Х.Маматкулов^{3,4}

¹Республиканский центр по борьбе со СПИД, Ташкент, Республика Узбекистан;

²Благотворительный фонд IDEA, Лос-Анджелес, США;

³Научно-исследовательский институт эпидемиологии, микробиологии и инфекционных заболеваний Министерства здравоохранения Республики Узбекистан, Ташкент, Республика Узбекистан;

⁴ООО BIBINOR, Ташкент, Республика Узбекистан

В статье описывается комплексное использование антиретровирусной терапии и уникального иммунокорректора ИММУН-5. Представленные результаты показывают, что в течение 6 мес комплексной терапии вирусная нагрузка у всех пациентов в экспериментальных группах снижалась в сотни и тысячи раз, а количество CD4-клеток росло. Авторы предполагают, что можно добиться долгосрочной ремиссии у всех пациентов. Это устранил связь в эпидемической цепи как источника инфекции, и это создаст руководящие принципы для разработки эффективных глобальных программ борьбы с эпидемией СПИДа.

Ключевые слова: СПИД, иммунокорригирующая терапия

Для цитирования: Бердиева З.И., Игнатов П.Е., Маматкулов И.Х. Опыт применения иммунокорригирующей терапии при ВИЧ-инфекции. Бактериология. 2018; 3(3): 19–21. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-19-21

Experience of using immunocorringing therapy for HIV infection

Z.I.Berdieva^{1,3}, P.E.Ignatov², I.Kh.Mamatkulov^{3,4}

¹Republican Center for Combating AIDS, Tashkent, Republic of Uzbekistan;

²IDEA Charity Foundation, Los Angeles, USA;

³Research Institute for Epidemiology, Microbiology and Infectious Diseases, Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Republic of Uzbekistan;

⁴BIBINOR LLC, Tashkent, Republic of Uzbekistan

This paper describes the complex use of antiretroviral therapy and the unique immunocorrector IMMUN-5. The results presented in the table show that during 6 months of complex therapy, the viral load in all patients in the experimental groups fell by hundreds and thousands of times, and the number of CD4 cells grew. The authors suggest that it is possible to achieve long-term remission in all patients. This will eliminate a link in the epidemic chain as a source of infection, and this will create guidelines for the development of effective global programs to combat the AIDS epidemic.

Keywords: AIDS, immunocorrective therapy

For citation: Berdiyeva Z.I., Ignatov P.E., Mamatkulov I.Kh. Experience of using immunocorringing therapy for HIV infection. Bacteriology. 2018; 3(3): 19–21. (In Russian).DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-19-21

Несмотря на определенные успехи, достигнутые медициной в подавлении репликации вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) с помощью антиретровирусных (АРВ) препаратов, проблема совершенствования терапии этой болезни остается весьма актуальной. И связано это прежде всего с тем, что АРВ-препараты не излечивают, а лишь задерживают развитие вируса, что в принципе может стабилизировать клиническую картину и продлить жизнь больно-

го. При этом пациент обречен на пожизненное применение АРВ-терапии [1].

В свою очередь, это влечет за собой целый шлейф проблем, особенно учитывая высокую токсичность АРВ-препаратов для организма больного, а также их немалую стоимость. Более того, огромную проблему представляет собой селекция штаммов, резистентных к этим препаратам [2]. Развивается такая химиорезистентность достаточно быст-

Для корреспонденции:

Бердиева Зулхумор Илмурадовна, докторант НИИ эпидемиологии, микробиологии и инфекционных заболеваний Министерства здравоохранения Республики Узбекистан

Адрес: 100133, Республика Узбекистан, Ташкент, ул. Заковат, 2

Телефон: (998 90) 917-7354

E-mail: husan.elmurodov@mail.ru

Статья поступила 18.06.2018 г., принята к печати 29.10.2018 г.

For correspondence:

Zulhumor I. Berdiyeva, doctoral student, Research Institute of Epidemiology of Microbiology and Infectious Diseases of the Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan

Address: 2 Zakovat str., Tashkent, 100133, Republic of Uzbekistan

Phone: (998 90) 917-7354

E-mail: husan.elmurodov@mail.ru

The article was received 18.06.2018, accepted for publication 29.10.2018

ро, и это свойство возбудителей госпитальных инфекций должно учитываться при разработке новых лечебно-профилактических схем. В нашем видении оно заключается в усилении действия АРВ-препаратов назначением в лечебно-профилактические курсы парафармацевтиков в целях нейтрализации первого звена эпидемического процесса при ВИЧ-инфекции.

Довольно интересным аспектом в терапии ВИЧ/СПИД была бы активация иммунитета в процессе элиминации вируса. Однако предшествующие попытки воздействия на иммунную систему оказывались, как правило, не вполне неудачными. Очень часто они приводили к ускоренному размножению вируса, увеличению вирусной нагрузки и ухудшению клинического состояния больных. И связано это в первую очередь с тем, что иммуностимулирующие препараты, активируя пролиферацию клеток иммунной системы, одновременно включают и факторы транскрипции, активирующие репликацию ВИЧ. Поэтому становится больше вирионов ВИЧ и больше клеток-мишеней, в которых он размножается. В результате этого вирусная нагрузка (ВН) резко возрастает, а количество CD4 лимфоцитов после краткого временного подъема – падает. Однако отдельные обнадеживающие сообщения о воздействии на систему иммунитета можно встретить в современной научной литературе [3].

Учитывая, что основным патогенетическим элементом развития иммунодефицита при ВИЧ/СПИД является хроническая анергия клеток иммунитета, мы использовали натуральный иммунокорректор ИММУН-5, зарегистрированный в качестве парафармацевтика (БАДа). Этот уникальный препарат ингибировал реакции развития анергии клеток и, наоборот, включал транскрипционные сигналы, усиливающие киллерные способности макрофагов и лимфоцитов. В результате, как мы рассчитывали, эти клетки, восстановив свои функциональные возможности, в присутствии большого количества уже имеющихся антител будут способны эффективно убивать ВИЧ. При этом, чтобы не провоцировать виремию, планировалось, что CD4 клетки не должны быстро пролиферировать, а их количество увеличивалось бы постепенно. Если при этом удастся еще ингибировать репликацию ВИЧ с помощью АРВТ – это будет двойной удар по вирусу.

Однако, как мы знаем, не все пациенты способны переносить АРВ-терапию из-за ее токсичности и разнообразных побочных эффектов. В этом случае, вероятно, можно было бы использовать методы иммунокоррекции уже без АРВ-терапии. Здесь мы исходили из того, что это лучше, чем не использовать никакой терапии.

Описанию одной из таких работ, проведенных на базе Республиканского Центра по борьбе со СПИД Республики Узбекистан, и посвящена данная статья.

Пациенты и методы

Исследования проводились на основании Протокола клинического испытания, утвержденного Министерством здравоохранения, «Изучение профилактической эффективности препарата ИММУН-5 (капсулы для приема внутрь, производства ООО «Bibinor», Узбекистан)». Дизайн испытания: контролируемое открытое рандомизированное, с четырьмя параллельными группами. В опытную группу №1 были вклю-

чены 30 мужчин и женщин в возрасте 18–60 лет, инфицированных ВИЧ (2–4 стадия болезни). Больные уже в течение 2–8 лет получали антиретровирусную и симптоматическую терапию, в зависимости от показаний.

Больные опытной группы №2 по различным обстоятельствам не могли принимать АРВ-препараты. Поэтому им была назначена иммунотерапия только ИММУН-5. В эту группу были включены 10 человек в возрасте от 20 до 49 лет.

Методом случайной выборки были сформированы 2 контрольные группы. Одна из них (группа №3) получала только антиретровирусную и симптоматическую терапию, также в зависимости от показаний. Группа №4 не получала никакого лечения.

Больные в опытной группе №1 дополнительно к АРВ-терапии в течение 6 мес принимали пищевую добавку ИММУН-5, которая должна была корректировать реакции их иммунитета. ИММУН-5 принимали ежедневно по 1 капсуле 2 раза в день после еды в течение 6 мес. Во второй группе ИММУН-5 принимали точно по такой же схеме и в течение того же срока, но уже без АРВ-препаратов. Один больной был исключен из группы по нарушению правил соблюдения схемы терапии.

Вирусную нагрузку (ВН) определяли методом ПЦР, используя набор Artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kit, QIAGEN (Германия). Сроки определения ВН соответствовали Клиническому протоколу «Изучение профилактической эффективности препарата ИММУН-5 (капсулы для приема внутрь, производства ООО Bibinor, Узбекистан)», утвержденному Министерством здравоохранения Республики Узбекистан 02.02.2017 г. Количество CD4 клеток определяли по методу ИФА на тестах производства Sysmex, Германия.

Результаты и обсуждение

Основные результаты этого эксперимента представлены на рис. 1 и 2. При этом ВН и количество CD4 клеток являлись основными критериями в оценке эффективности курса терапии.

Анализируя данные, представленные на рисунках по первой группе, обращает на себя внимание тот факт, что у всех пациентов (100%) удается практически тысячекратно снизить вирусную нагрузку. Причем характерно, что если ВН была изначально невысокой (несколько тысяч копий/мл), шестимесячный курс ИММУН-5 совместно с АРВТ приводил к нулевой ВН (ВИЧ не определяется). Если же ВН была высокой (десятки и сотни тысяч копий/мл), то данный курс снижал ВН всего до десятков и сотен копий/мл. Вероятно, если бы курс был продлен еще на 1–2 мес, то у этих больных также был бы получен нулевой показатель ВН. То есть данный терапевтический комплекс может позволить практически у всех пациентов свести показатель ВН к нулю (к неопределяемому уровню), что, видимо, зависит от длительности курса. В результате такого лечения имеется реальная возможность всех пациентов привести к состоянию ремиссии.

Данный факт свидетельствует о том, что уровень достигаемой ремиссии может быть достаточно длительным, даже в отсутствие какой бы то ни было терапии. Однако эти предположения нуждаются в дополнительных исследованиях, особенно о сроках такой ремиссии.

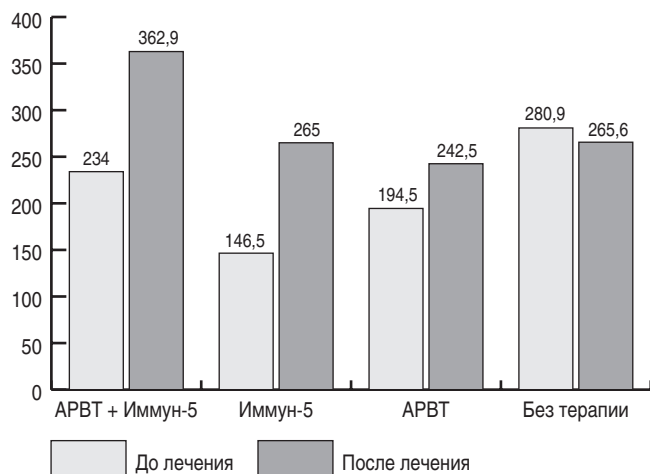


Рис. 1. Количество CD4 клеток до и после лечения.

Анализируя данные по группе №2, следует отметить, что, по-видимому, тот эффект, который был получен в группе 1, все-таки в основном был связан с применением препарата ИММУН-5, поскольку в группе №2 (без АРВТ) были получены сопоставимые результаты. Однако следовало бы обратить внимание на то, что ВН у пациентов в целом по группе №2 падает не так быстро, как в первой группе. Это говорит о полезных вирусподавляющих свойствах АРВ-терапии. В то же время восстановление системы иммунитета (CD4 клетки) во второй группе происходит значительно быстрее, что свидетельствует о негативной роли АРВ-терапии в группе №1.

Данные результаты позволяют варьировать терапевтические схемы, позволяя для быстрого снижения ВН назначать комплексное применение ИММУН-5 и АРВТ, а для быстреего восстановления организма использовать только ИММУН-5. Эти схемы тем более могут варьировать в зависимости от наличия оппортунистических инфекций и препаратов, назначаемых для их лечения.

Учитывая, что больной в стадии ремиссии при нулевой ВН практически не является источником инфекции, нам открываются интересные перспективы в эпидемическом плане. Блокируя источник инфекции как звено эпидемиологической цепи, мы имеем возможность разрушать всю эпидемическую цепь и таким образом ликвидировать инфекционное заболевание. Однако создание подобных противоэпидемических программ – это дело будущего, так как здесь должны решаться довольно специфические задачи выявления максимального количества больных и вирусносителей в разных сообществах. Но это уже можно решать и на современном этапе.

В то же время результаты контрольной группы показывают, что ВН пациентов и количество CD4 клеток в целом по группе за эти 6 мес практически не меняются. Данный факт лишний раз подчеркивает достоверность поразительных данных в опытных группах.

Следовательно, в результате этого небольшого эксперимента с анализом динамики ВН и количества CD4 клеток было продемонстрировано, что схема иммунокоррекции при помощи препарата ИММУН-5 позволяет увеличить эффек-

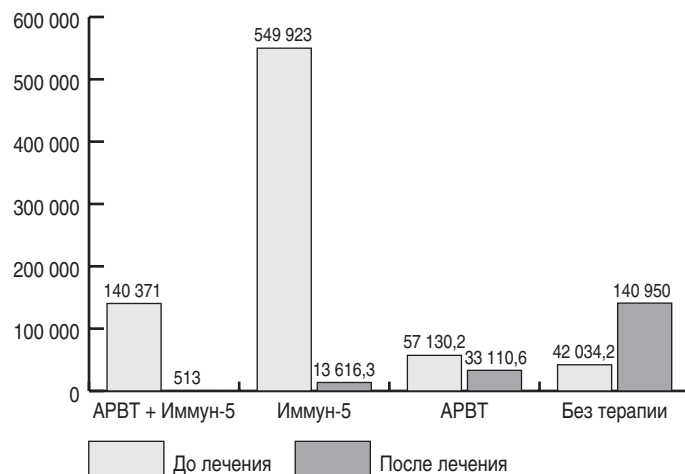


Рис. 2. Количество вирусной нагрузки до и после лечения.

тивность АРВ-терапии до индукции состояния ремиссии у большинства пациентов с перспективой достижения ремиссии всеми больными. Безусловно, нуждаются в дальнейших исследованиях вопросы длительности этой ремиссии (и можно ли говорить при длительной ремиссии о полном излечении от ВИЧ/СПИД?). Но тенденции, проявившиеся в этом опыте, говорят о возможностях поддержания такой ремиссии, особенно с помощью краткосрочных курсов ИММУН-5 (1–2-месячных). Очень интересными могут быть и намечающиеся перспективы в эпидемиологической области. Безусловно, данная работа имеет очень хорошие перспективы и должна быть продолжена.

Литература/References

1. Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012 Apr;2(4):a007161. DOI: 10.1101/cshperspect.a007161
2. Chen WT, Shiu CS, Yang JP, Simoni JM, Fredriksen-Goldsen KI, Lee TS, Zhao H. Antiretroviral Therapy (ART) Side Effect Impacted on Quality of Life, and Depressive Symptomatology: A Mixed-Method Study. J AIDS Clin Res. 2013 Jun 29;4:218.
3. Dolgileish. Immunotherapy of AIDS. Cur Op Biotech. 1992;3(16):650-5.

Информация об авторах:

Игнатов Пётр Евгеньевич, доктор биологических наук, профессор, президент Благотворительного фонда IDEA (Infectious Disease Eradication Alliance)
 Адрес: 2 Bella Firenze, Los-Angeles, California 92532, USA
 Телефон: 1-951-399-0440
 E-mail: biotechnologiesig@gmail.com

Маматкулов Иброхим Хомидович, доктор медицинских наук, профессор заместитель директора ООО «BIBINOR»
 Адрес: Республика Узбекистан, г. Ташкент, ул. Бодомзор, 37
 Телефон: (998 97) 769-2899
 E-mail: bibinor@list.ru

Information about authors:

Petr E. Ignatov, PhD, DSc (in Biology), professor, President of the Charity Fund IDEA (Infectious Disease Eradication Alliance)
 Address: 2 Bella Firenze, Los-Angeles, California 92532, USA
 Phone: 1-951-399-0440
 E-mail: biotechnologiesig@gmail.com

Ibrokhir Kh. Mamatkulov, MD, PhD, DSc, professor, Vice-Director, BIBINOR LLC
 Address: 37 Bodomzor str., Tashkent, Republic of Uzbekistan,
 Phone: (998 97) 769-2899
 E-mail: bibinor@list.ru

Использование гена, кодирующего белок GamR, в качестве видоспецифического хромосомного маркера для дифференциации *B. anthracis* от близкородственных видов

В.С.Тимофеев, В.В.Каптелова, И.В.Бахтеева, Р.И.Миронова,
Г.М.Титарева, Ю.О.Гончарова, Л.И.Маринин, А.Н.Мокриевич

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

Одним из методов дифференциации *B. anthracis* от других близкородственных микроорганизмов является его чувствительность к специфическому бактериофагу γ (Гамма). Davison и соавт. установили, что рецептором для фага Гамма является белок BA3367, названный GamR. Целью данного исследования являлась оценка возможности использования гена, кодирующего белок BA3367, в качестве видоспецифического хромосомного маркера для ПЦР-дифференциации *B. anthracis* от близкородственных бацилл. Применив анализ *in silico*, мы выявили у *B. anthracis* трехнуклеотидную инсерцию 97AAG101, которую использовали для дизайна видоспецифических праймеров и Taq-man зонда. Особенностью праймеров было, во-первых, использование инсерции в качестве трех 3'-концевых нуклеотидов прямого праймера и, во-вторых, введение искусственной некомплементарной замены G→C в -4 положении с 3'-конца прямого праймера для повышения специфичности реакции. Сконструированные праймеры и Taq-man зонд показали 100%-ную видоспецифичность в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с отсутствием ложных результатов. Мы считаем, что ген, кодирующий белок GamR, является перспективным в качестве видоспецифического хромосомного маркера *B. anthracis* как при отдельном использовании, так и для применения в мультиплексных ПЦР-тест-системах для идентификации сибиреязвенного микроба и дифференциации его от близкородственных бацилл.

Ключевые слова: *B. anthracis*, ПЦР-дифференциация, бактериофаг γ

Для цитирования: Тимофеев В.С., Каптелова В.В., Бахтеева И.В., Миронова Р.И., Титарева Г.М., Гончарова Ю.О., Маринин Л.И., Мокриевич А.Н. Использование гена, кодирующего белок GamR, в качестве видоспецифического хромосомного маркера для дифференциации *B. anthracis* от близкородственных видов. Бактериология. 2018; 3(3): 22–27. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-22-27

Using the gen encoding GamR protein as a species-specific chromosomal marker to differentiate *B. anthracis* from closely related species

V.S.Timofeev, V.V.Kaptelova, I.V.Bakhteeva, R.I.Mironova,
G.M.Titareva, Yu.O.Goncharova, L.I.Marinin, A.N.Mokrievich

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

A method differentiating *B. anthracis* from other closely related microorganisms relies upon its γ phage susceptibility. Davison et al. have found the protein BA3367 designated GamR to be a receptor for the phage. The objective of the research was to evaluate the gene encoding BA3367 as a species-specific chromosomal marker in PCR-based differentiating *B. anthracis* from closely related bacilli. Applying the analysis *in silico* we identified a *B. anthracis* three-nucleotide insert 97AAG101 to use it then in designing species-specific primers and Taq-man probe. The primers featured by their (i) using the insert as three 3'-terminal nucleotides of the forward primer and (ii) artificial non-complementary substitution G→C in position -4 from the 3'-end of the forward primer to improve the reaction specificity. The primers and Taq-man probe were 100% species-specific in PCR without false positive results. We believe that the gen encoding the protein GamR is a candidate for a species-specific chromosomal marker for *B. anthracis*, when both applied alone and integrated into multiplex PCR test-systems to identify the anthrax microbe and to differentiate it from closely related bacilli.

Keywords: *B. anthracis*, PCR differentiation, bacteriophage γ

For citation: Timofeev V.S., Kaptelova V.V., Bakhteeva I.V., Mironova R.I., Titareva G.M., Goncharova Yu.O., Marinin L.I., Mokrievich A.N. Using the gen encoding GamR protein as a species-specific chromosomal marker to differentiate *B. anthracis* from closely related species. Bacteriology. 2018; 3(3): 22–27. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-22-27

Для корреспонденции:

Тимофеев Виталий Сергеевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: timofeev@obolensk.org

Статья поступила 17.06.2018 г., принята к печати 29.10.2018 г.

For correspondence:

Vitaliy S. Timofeev, PhD (Biol), Leading Researcher of the Laboratory of Anthrax Microbiology of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

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

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: timofeev@obolensk.org

The article was received 17.06.2018, accepted for publication 29.10.2018

Сибирская язва – острое инфекционное заболевание, поражающее главным образом домашних и диких жвачных животных, а также людей. Несмотря на то что это заболевание представляет собой значительную проблему преимущественно в субсахарской Африке и в некоторых регионах Азии [1–3] и весьма редко встречается в большинстве европейских стран [4], две вспышки инфекции в России [3] и Швеции [5], произошедшие в 2016 г., наглядно демонстрируют, что даже в регионах, где это заболевание не фиксировалось десятилетиями, возможны его вспышки, приводящие к значительному экономическому ущербу, массовому падежу сельскохозяйственных животных и человеческим жертвам.

Этиологическим агентом сибирской язвы является грамположительная спорообразующая бактерия *Bacillus anthracis*. В связи с высокой вирулентностью *B. anthracis*, стабильностью эндоспор в окружающей среде и легкостью культивирования эту бактерию относят к биологическим агентам, которые могут использоваться в качестве биологического оружия или инструмента биотерроризма [6, 7]. В таксономическом отношении *B. anthracis* является членом группы *Bacillus cereus sensu lato*, включающей также виды *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, вызывающих инфекции млекопитающих. Степень генетического родства между этими видами столь высока, что есть основания считать их фенотипическими вариантами одного вида [8]. Но при этом высокая патогенность присуща только виду *B. anthracis*, что и обуславливает актуальность разработки систем быстрой и надежной его индикации и дифференциации от близкородственных видов. Традиционные культуральные и микробиологические методы исследования достаточно трудоемки и занимают длительное время. Значительно ускорить процесс индикации сибиреязвенного микроба в исследуемом материале можно, используя современные молекулярно-биологические методы, в частности ПЦР.

Наиболее значимой генетической особенностью *B. anthracis* является наличие двух плазмид – рХО1 и рХО2, на которых расположены гены синтеза факторов патогенности сибиреязвенного микроба – трехкомпонентного токсина и поли-D-глутаминовой капсулы соответственно. Именно эти гены в большинстве случаев используются в качестве мишеней.

Однако в последние десятилетия были обнаружены штаммы *B. cereus*, обладающие рХО-подобными плазмидами, а также гомологами генов плазмиды рХО2 в гетерологичных плазмидах, что не только запутывает филогенетическую структуру группы *B. cereus sensu lato*, но также усложняет индикацию *B. anthracis*. Также описаны изоляты *B. anthracis*, лишенные плазмид [9–14], что может приводить к ложноположительным и ложноотрицательным результатам ПЦР-тестов, основанных на плазмидных маркерах. Очевидным решением проблемы индикации штаммов сибиреязвенного микроба с неполным плазмидным профилем, а также дифференциации «типичных» штаммов *B. anthracis* от близкородственных микроорганизмов, обладающих рХО-подобными плазмидами, является использование ПЦР-мишеней, локализованных на хромосоме. В ряде исследований было показано, что наиболее специфичными хромосомными генами являются локусы BA5345 [5, 15], PL3 [16] и BA5357 [17].

В то же время, по данным литературы, до сих пор не проводились попытки использовать в качестве ПЦР-мишеней генетические детерминанты, потенциально обуславливающие диагностически значимые фенотипические отличия *B. anthracis* от близкородственных видов. Использование этих детерминант в качестве ПЦР-мишеней может не только обеспечить дифференциацию *B. anthracis* и несибиреязвенных штаммов, но и позволить предсказать наличие тех или иных фенотипических свойств по результатам ПЦР без исследования культуральных и биохимических свойств.

Одним из методов дифференциации *B. anthracis* от других близкородственных микроорганизмов является чувствительность к фагу γ (Гамма). Почти все изоляты *B. anthracis* чувствительны к этому фагу, в то время как большинство штаммов *B. cereus* и *B. thuringiensis* устойчивы к нему. Фаг Гамма был впервые описан в 1955 г. как вариант фага W [18, 19]. Видоспецифичность фага Гамма обусловила интерес исследователей к поиску причин такого избирательного действия. Наиболее очевидной причиной, которую можно предположить, является наличие у *B. anthracis* видоспецифического рецептора для этого фага.

Первоначально существовали различные взгляды на химическую природу этого рецептора. Так, Lantos и Ivanovics, обнаружив [20], что связь с Гамма-фаговым рецептором была потеряна после обработки 5% трихлоруксусной кислотой при температуре 90°C, а затем трипсином, сделали вывод о том, что он, по всей видимости, является белком. Watanabe и Shiomi предположили, что это одно вещество или комбинация следующих веществ: диаминопимелиновая кислота (мезо-ДАПК), D-глюкозамин, D-галактозамин, D-маннозамин, составляющих пептидогликан или связанные с ним полисахариды, и L-лизина. Белковая природа рецептора была поставлена под сомнение, так как после обработки растворителями не наблюдалось потери способности к связыванию фага [21, 22]. Тем не менее используемая ими обработка позволяет инактивировать лишь мембранные белки, но не белки пептидогликана, неизвестные в то время.

Таким образом, были получены данные, позволяющие предположить, что Гамма-фаговый рецептор, по всей видимости, является белком, ассоциированным с пептидогликановым слоем. Этот белок удалось идентифицировать лишь после секвенирования и аннотации геномов сибиреязвенного микроба. Davison и соавт. установили, что рецептором для фага Гамма является белок BA3367, содержащий LPXTG-мотив, который с помощью сортазы A (SrtA) ковалентно связан с пептидными компонентами пептидогликанового слоя клеточной стенки [23]. Данный белок был назван GamR (Гамма phage receptor).

Целью данного исследования являлась оценка возможности использования гена, кодирующего рецептор к фагу Гамма, в качестве видоспецифического хромосомного маркера для дифференциации *B. anthracis* от близкородственных видов.

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов. В работе использовали 130 штаммов *B. anthracis* и 20 штаммов близкородственных

бацилл (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*) из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

Среды и условия культивирования. Используемые штаммы выращивали на плотной питательной среде LB Broth, Miller (Luria-Bertani) (Amresco, США).

Чувствительность к диагностическому фагу Гамма. Для определения чувствительности к диагностическому фагу «Гамма А-26» (СтавНИИПЧИ, Россия) в центр чашки с микробной культурой наносили каплю бактериофага. Результаты учитывали визуально через 24 ч культивирования при температуре 37°C. При положительном результате на месте нанесения бактериофага наблюдали полное или частичное отсутствие роста исследуемой культуры.

Анализ *in silico*. С помощью анализа *in silico* были проанализированы нуклеотидные и аминокислотные последовательности 133 штаммов *B. anthracis* и близкородственных бацилл, доступных на информационном портале NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Поиск аналогов целевых генов проводился с помощью алгоритма BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей, дизайн олигонуклеотидных праймеров и зондов, расчет их температур плавления, трансляция *in silico*, анализ расположения на хромосоме исследуемых генов и их гомологов, а также их фрагментов проводили с помощью пакета программ Vector NTI 10.0.1. (Invitrogen Corporation), филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 7.0 (<http://www.megasoftware.net>).

Выделение нуклеиновых кислот. Препараты тотальной ДНК из бактериальных клеток получали с помощью набора реагентов GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kits (Sigma-Aldrich, США). Все манипуляции проводили согласно инструкциям производителя.

Полимеразная цепная реакция. ПЦР проводили с помощью амплификатора с оптическим ПЦР-модулем CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) с использованием «2,5-кратной реакционной смеси для проведения ПЦР-ПВ в присутствии красителя SYBRGreenI» и «2,5-кратной реакционной смеси для проведения ПЦР-ПВ» (Синтол, Россия, Москва). Детекцию продуктов амплификации проводили с использованием оптического ПЦР-модуля по каналам FAM/SYBR.

При необходимости продукты реакции разделяли электрофорезом в 0,7–1,8% агарозном геле («Sigma» США) в ТАЕ-буфере (Трис-ацетат 0,04 М, ЭДТА 0,002 М, pH 8,0), с последующим окрашиванием бромистым этидием (100 мг/л) и детекцией с использованием трансиллюминатора ECX-15.L при длине волны 365 нм (VilberLourmat, Франция).

Олигонуклеотидные праймеры и зонды, используемые в данной работе, были синтезированы ЗАО «Синтол» (г. Москва, Россия).

При проведении ПЦР использовался следующий режим амплификации:

95°C – 180 с – преинкубация,

95°C – 30 с, 60°C – 30 с, 72°C – 30 с – 45 циклов.

Результаты и обсуждение

Был проведен анализ *in silico* последовательностей гена, кодирующего белок ВА3367 и его гомологи в геномах сибиреязвенного микроба и близкородственных микроорганизмов, аннотированных в GeneBank. Множественное выравнивание этих последовательностей позволило выявить у всех проанализированных штаммов *B. anthracis* трехнуклеотидную инсерцию 97AAG101 (рисунок). Благодаря этой особенности при трансляции *in silico* белок ВА3367 получает в своей последовательности дополнительный остаток глутаминовой кислоты в 33 положении, при этом рамка считывания сохраняется.

Мы разработали пару праймеров, которая позволила нам успешно определять инсерцию в гене *GamR*. В ней прямой праймер имел три 3'-концевых нуклеотида, комплементарных специфичной для *B. anthracis* инсерции. Кроме того, специфичность реакции была повышена за счет включения в последовательность прямого праймера дополнительной точечной дестабилизирующей замены основания на некомплементарное G→C в (-4) положении с 3' конца форвардного праймера. Такой методический подход обеспечивает успешную амплификацию ДНК *B. anthracis* и гарантированное отсутствие амплификации фрагмента ДНК несибиреязвенных бацилл из-за некомплементарности сразу четырех концевых нуклеотидов прямого праймера и невозможности гибридизации [24]. Обратный праймер был комплементарен региону, не имеющему видоспецифических отличий, специфичность ПЦР-реакции при этом достигается только за счет прямого праймера.

Последовательность прямого праймера: 5'GCGAATACAGTACATATTACGTTTGCTGAACAAG3',

последовательность обратного праймера: 5'ACAAAGCGGAAAACAACAACATCTCCAG3'.

Первичная проверка специфичности синтезированных праймеров осуществлялась на панели из 150 штаммов *B. anthracis* и близкородственных бацилл с использованием набора «2,5-кратной реакционной смеси для проведения ПЦР-ПВ в присутствии красителя SYBR Green I» (Синтол, Россия, Москва). Детекция осуществлялась по каналу SYBR/FAM.

Полученные результаты показали, что все исследованные штаммы *B. anthracis* дали положительную реакцию с данными праймерами. Однако ПЦР-положительными оказались три штамма *B. thuringiensis*: g7566, 214, 1373. В то же время при постановке реакции на чувствительность к Гамма-фагу эти штаммы оказались к нему нечувствительными. Подобные факты были описаны ранее. Например, в работе [23] указывается, что штамм *B. thuringiensis* 97-27 не лизируется фагом Гамма, но при этом, по данным электронной микроскопии, фаговые частицы адсорбируются на поверхности бактериальных клеток. Отсутствие лизиса в этом случае может быть объяснено различиями в последовательности других бактериальных белков, необходимых для взаимодействия бактерия-фаг, и/или мишеней фаговых белков, например, лизина PlyG, способного лизировать клетки *B. anthracis*, но не *B. cereus* или *B. thuringiensis*. Известно, что использование единичных хромосомных маркеров не гарантирует абсолютную достоверность результатов. Например, при ис-

Использование гена, кодирующего белок GamR, в качестве видоспецифического хромосомного маркера для дифференциации *B. anthracis* от близкородственных видов



Рисунок. Фрагмент множественного выравнивания последовательностей гена *BA3367*. Выделенный рамкой фрагмент содержит видоспецифическую для *B. anthracis* трехнуклеотидную инсерцию.

следовании крупной выборки штаммов из группы *B. cereus sensu lato* [25], было установлено, что почти треть геномов сформированы в результате горизонтального переноса генов, происходящего в рамках всей группы в целом, без ограничения видовой принадлежностью. Тем самым было продемонстрировано, что горизонтальный перенос генов значительно искажает эволюционную историю всей группы видов, ограничивая значимость отдельных генетических маркеров. Более того, авторы считают, что для всей группы *B. cereus sensu lato* характерна так называемая «сетевая эволюция», заключающаяся в возникновении новой филогенетической единицы путем слияния двух или более предковых форм, что графически лучше отражается в виде сети, а не традиционно используемого бифуркационного дерева. В диагностике следствием указанных фактов является достаточно заметный процент ложноположительных и ложноотрицательных результатов при дифференциации *B. anthracis* от близкородственных бацилл. Поэтому наиболее очевидным путем повышения достоверности ПЦР-тестов является разработка мультиплексных ПЦР-тест-систем, использующих одновременно несколько видоспецифических маркеров, что позволит свести вероятность ложноположительных и ложноотрицательных результатов при ПЦР-индикации *B. anthracis* до пренебрежимо малых величин.

Для повышения специфичности анализа и оценки перспективности использования гена *gamR* как мишени в муль-

типлексных ПЦР-тест системах нами был сконструирован флуоресцентно меченный Taq-map зонд (AGCCCCGGCCATT AAGCCATCAATG, FAM), после чего была проведена повторная проверка специфичности синтезированных праймеров совместно с зондом на той же панели из 150 штаммов *B. anthracis* и близкородственных бацилл по каналу SYBR/FAM. Полученные результаты продемонстрировали положительную ПЦР у всех 130 штаммов *B. anthracis* и отрицательную реакцию у всех двадцати штаммов близкородственных бацилл. Таким образом, использование Taq-map зонда позволило полностью исключить ложноположительные результаты.

Заключение

Анализ *in silico* последовательностей гена, кодирующего белок GamR (BA3367), позволил выявить у *B. anthracis* трехнуклеотидную инсерцию 97AAG101, использованную нами для дальнейшего дизайна видоспецифических праймеров. Особенностью дизайна было то, что в качестве прямого праймера использовали нуклеотид, комплементарный области ДНК рядом с инсерцией, причем три 3'-концевых нуклеотида были комплементарны инсерции в гене рецептора фага Гамма *B. anthracis*. Специфичность ПЦР увеличили введением искусственной некомплементарной замены G→C в (-4) положении с 3'-конца прямого праймера. Для дальней-

шего повышения специфичности реакции был сконструирован флуоресцентно меченный Taq-man зонд. Результатом использования данной пары праймеров совместно с Taq-man зондом стала 100%-ная видоспецифичность ПЦР с отсутствием ложных результатов. Таким образом, регион рецептора фага Гамма является перспективным в качестве видоспецифического хромосомного маркера *B. anthracis* как при отдельном использовании, так и для применения в мультиплексных ПЦР-тест-системах для идентификации сибиреязвенного микроба и дифференциации его от близкородственных видов бацилл.

В настоящее время техническое оснащение большинства отечественных клинико-диагностических и научно-исследовательских лабораторий позволяет проводить ПЦР с учетом результатов в реальном времени одновременно по нескольким оптическим каналам. Поэтому разработка мультиплексных ПЦР-тест-систем, использующих одновременно несколько видоспецифических маркеров, является одним из наиболее логичных путей повышения достоверности ПЦР-тестов. Этот подход позволяет значительно, практически до нуля, снизить вероятность ошибки диагностики и в то же время лишь незначительно увеличивает стоимость анализа.

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Литература/References

- Ardi P, Emanuele C, Luigina S, Leonardo M, et al. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains circulating in Albania. *Journal of Bioterrorism & Biodefense*. 2015;7:1-6.
- Okello A, Welburn S, Smith J. Crossing institutional boundaries: mapping the policy process for improved control of endemic and neglected zoonoses in sub-Saharan Africa. *Health Policy Plan*. 2015 Jul;30(6):804-12. DOI: 10.1093/heapol/czu059.
- Попова АЮ, Демина ЮВ, Куличенко АН, Рязанова АН, и др. Эпидемиологические особенности вспышки сибирской язвы в ямало-ненецком автономном округе в 2016 году. Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных. 2017, с. 81-84. / Popova AYU, Demina YuV, Kulichenko AN, Ryazanova AN, et al. Epidemiologicheskie osobennosti vspyskhi sibirskoi yazyvu v yamalo-nenetskom avtonomnom okruge v 2016 godu. Aktual'nye problemy boleznei, obshchikh dlya cheloveka i zhivotnykh. 2017, s. 81-84. (In Russian).
- Turnbull PC. World Health Organization. Anthrax in humans and animals. In: (Editor) PT, editor. - Geneva (CH): WHO Press, 2008.
- Lewerin SS, Elvander M, Westermarck T, Hartzell LN, Norström AK, Ehrs S, et al. Anthrax outbreak in a Swedish beef cattle herd – 1st case in 27 years: Case report. *Acta Vet Scand*. 2010 Feb 1;52:7. DOI: 10.1186/1751-0147-52-7.
- Inglesby TV, O'Toole T, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, et al. Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. *JAMA*. 2002 May 1;287(17):2236-52.
- Fowler RA, Shafazand S. Anthrax bioterrorism: prevention, diagnosis and management strategies. *JBioterr Biodef*. 2011;2:107.
- Zwick ME, Joseph SJ, Didelot X, Chen PE, Bishop-Lilly KA, Stewart AC, et al. Genomic characterization of the *Bacillus cereus sensu lato* species: Backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. *Genome Res*. 2012 Aug;22(8):1512-24. DOI: 10.1101/gr.134437.111.
- Turnbull PC, Hutson RA, Ward MJ, Jones MN, Quinn CP, Finnie NJ, et al. *Bacillus anthracis* but not always anthrax. *J Appl Bacteriol*. 1992 Jan;72(1):21-8.
- Pannucci J, Okinaka RT, Sabin R, Kuske CR. *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species. *J Bacteriol*. 2002 Jan;184(1):134-41.
- Pannucci J, Okinaka RT, Williams E, Sabin R, Ticknor LO, Kuske CR. DNA sequence conservation between the *Bacillus anthracis* pXO2 plasmid and genomic sequence from closely related bacteria. *BMC Genomics*. 2002 Dec 9;3(1):34.
- Hoffmaster AR, Ravel J, Rasko DA, Chapman GD, Chute MD, Marston CK, et al. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 1;101(22):8449-54. DOI: 10.1073/pnas.0402414101
- Klee SR, Brzuszkiewicz EB, Nattermann H, Brüggemann H, Dupke S, Wollherr A, et al. The genome of a *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. *PLoS One*. 2010 Jul 9;5(7):e10986. DOI: 10.1371/journal.pone.0010986.
- Klee SR, Ozel M, Appel B, Boesch C, Ellerbrok H, Jacob D, et al. Characterization of *Bacillus anthracis*-like bacteria isolated from wild great apes from Cote d'Ivoire and Cameroon. *J Bacteriol*. 2006 Aug;188(15):5333-44. DOI: 10.1128/JB.00303-06
- Antwerpen MH, Zimmermann P, Bewley K, Frangoulidis D, Meyer H. Real-time PCR system targeting a chromosomal marker specific for *Bacillus anthracis*. *Mol Cell Probes*. 2008 Oct-Dec;22(5-6):313-5. DOI: 10.1016/j.mcp.2008.06.001.
- Wielinga PR, Hamidjaja RA, Agren J, Knutsson R, Segerman B, Fricker M, et al. A multiplex real-time PCR for identifying and differentiating *B. anthracis* virulent types. *Int J Food Microbiol*. 2011 Mar 1;145 Suppl 1:S137-44. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.039.
- Létant SE, Murphy GA, Alfaro TM, Avila JR, Kane SR, Raber E, et al. Rapid-viability PCR method for detection of live, virulent *Bacillus anthracis* in environmental samples. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Sep;77(18):6570-8. DOI: 10.1128/AEM.00623-11
- Brown ER, Cherry W. Specific identification of *Bacillus anthracis* by means of a variant bacteriophage. *J Infect Dis*. 1955 Jan-Feb;96(1):34-9.
- McCloy EW. Studies on a lysogenic *Bacillus* strain. I. A bacteriophage specific for *Bacillus anthracis*. *J Hyg (Lond)*. 1951 Mar;49(1):114-25.
- Lantos J, Ivanovics G. The phage receptors of *Bacillus anthracis*. *Acta Microbiol Acad Sci Hung*. 1961;8:379-88.
- Mesnager S, Fontaine T, Mignot T, Delepierre M, Mock M, Fouet A. Bacterial SLH domain proteins are non-covalently anchored to the cell surface via a conserved mechanism involving wall polysaccharide pyruvylation. *EMBO J*. 2000 Sep 1;19(17):4473-84. DOI: 10.1093/emboj/19.17.4473
- Watanabe T, Shiomi T. Inhibiting materials for gamma phage adsorption to the cell wall of *Bacillus anthracis*, strain Pasteur No. 2-H. *Jpn J Microbiol*. 1975 Apr; 19(2):115-21.
- Davison S, Couture-Tosi E, Candela T, Mock M, Fouet A. Identification of the *Bacillus anthracis* (gamma) phage receptor. *J Bacteriol*. 2005 Oct;187(19):6742-9. DOI: 10.1128/JB.187.19.6742-6749.2005
- Birdsell DN, Pearson T, Price EP, Hornstra HM, Nera RD, Stone N, et al. Melt Analysis of Mismatch Amplification Mutation Assays (Melt-MAMA): A Functional Study of a Cost-Effective SNP Genotyping Assay in Bacterial Models. *PLoS One*. 2012;7(3):e32866. DOI: 10.1371/journal.pone.0032866.
- Cardazzo B, Negrisolio E, Carraro L, Alberghini L, Patarnello T, Giaccone V. Multiple-Locus Sequence Typing and Analysis of Toxin Genes in *Bacillus cereus* Food-Borne Isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Feb;74(3):850-60. DOI: 10.1128/AEM.01495-07

Информация об авторах:

Каптелова Валерия Владимировна, стажер-исследователь лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Бахтеева Ирина Викторовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Миронова Раиса Ивановна, научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Титарева Галина Михайловна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Гончарова Юлия Олеговна, стажер-исследователь лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Маринин Леонид Иванович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Мокриевич Александр Николаевич, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0117

Information about authors:

Valeria V. Kaptelova, Research Intern of the Laboratory of Anthrax Microbiology of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Irina V. Bakhteeva, PhD (Med), Senior Researcher of the Laboratory of Anthrax Microbiology of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Raisa I. Mironova, Researcher of the Laboratory of Anthrax Microbiology of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Galina M. Titareva, PhD (Med), Senior Researcher of the Laboratory of Anthrax Microbiology of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Yuliya O. Goncharova, Research Intern of the Laboratory of Anthrax Microbiology of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Leonid I. Marinin, PhD (Med), Leading Researcher of the Laboratory of Anthrax Microbiology of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Alexander N. Mokrievich, Dr. Sci. (Med), Chief Researcher of the Laboratory of Anthrax Microbiology of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0117

НОВОСТИ НАУКИ

Бактерии, устойчивые к спиртосодержащим дезинфектантам, обладают повышенной антибиотикорезистентностью



Алкогольсодержащие дезинфектанты предотвратили тысячи смертей от метициллинрезистентного золотистого стафилококка, но оказались неэффективными против некоторых супербактерий. Исследователи во всем мире отмечают, что бактерии теперь намного лучше выживают в стерилизованных средах и продолжают вызывать инфекции. Если эта тенденция сохранится, больницы больше не смогут использовать эти дезинфектанты для предотвращения заражения пожилых людей и тех, кто слишком болен, чтобы бороться с инфекцией. С середины 2000-х гг. в больницах для стерилизации рук использовали спиртосодержащий гель, и риск серьезных инфекций постоянно снижался. Однако обнаружилось постепенное увеличение случаев ванкомицин-резистентных энтерококков. Энтеро-

кокки являются пятой по значению причиной сепсиса в Европе и составляют 10% случаев госпитальной инфекции (бактериемии) во всем мире. Кроме того, устойчивость к ванкомицину является серьезной проблемой, так как это один из немногих антибиотиков, который можно использовать для лечения бактерий с более сложными клеточными стенками, которые известны как грамположительные, такие как *E. coli* и энтерококки. Бактерии могут также распространять резистентные гены между видами, и распространение одного устойчивого вида может способствовать осложнению лечения других инфекций.

Superbug warning as bacteria resist strong alcohol hand sanitisers, study finds
The Independent [WWW Document], n.d. URL <https://www.independent.co.uk/news/health/hand-sanitiser-bacteria-superbug-infection-alcohol-disinfectant-antibiotic-resistance-a8473101.html> (accessed 10.3.18).

Сравнение методов прямого нанесения биомассы и белковых экстрактов при идентификации микроорганизмов рода *Listeria* методом MALDI-TOF-типирования

К.В.Детушев, А.Г.Богун, Т.Н.Мухина, В.И.Соломенцев

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

Listeria monocytogenes является этиологическим агентом листериозной инфекции – широко распространенного опасного заболевания человека и животных. Заражение листериозом происходит при употреблении в пищу зараженных овощей и продуктов животного происхождения. Точное и быстрое определение возбудителя инфекции является ключом к назначению эффективного и адекватного лечения. Большой практический интерес представляет и видовая идентификация бактерий рода *Listeria*, так как у людей известны случаи заболеваний, вызванных *Listeria ivanovii*, следовательно, важно точно дифференцировать патогенные и непатогенные виды листерий. Одним из потенциально важных методов, способных решать эти задачи, является времяпролетная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация MALDI-TOF, которая является удобным инструментом для анализа микроорганизмов. Вместе с тем в литературных источниках встречаются упоминания о том, что не всегда видовая идентификация бактерии рода *Listeria* методом MALDI-TOF проходит корректно. Мы предположили, что это может быть следствием влияния различных факторов, таких как условия культивирования, состав питательных сред, а также уровень полиморфизма штаммов, взятых для исследований.

В настоящей работе на 35 штаммах *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* и *L. seeligeri*, полученных из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск», проведен сравнительный анализ точности идентификации при использовании двух способов пробоподготовки – метода прямого нанесения и метода экстракции белков муравьиной кислотой и ацетонитрилом. Независимо от метода нанесения принадлежность к роду *Listeria* была корректно установлена во всех образцах. Однако видовая идентификация при прямом нанесении была некорректна в девяти экспериментах, а при применении метода экстракции – в трех. Мы предполагаем, что это можно объяснить тем, что отобранные для проведения работ штаммы представляют разнородную группу клинических изолятов, выделенных на территории Российской Федерации.

Ключевые слова: листерия, масс-спектр, MALDI-TOF MS, идентификация, Microflex, MALDI-biotyper

Для цитирования: Детушев К.В., Богун А.Г., Мухина Т.Н., Соломенцев В.И. Сравнение методов прямого нанесения биомассы и белковых экстрактов при идентификации микроорганизмов рода *Listeria* методом MALDI-TOF-типирования. Бактериология. 2018; 3(3): 28–33. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-28-33

Comparing methods of direct application of biomass and protein extracts in identification of microorganisms of the genus of *Listeria* by MALDI-TOF typing method

K.V.Detushev, A.G.Bogun, T.N.Mukhina, V.I.Solomentsev

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

Listeria monocytogenes is the etiological agent of listeriosis infection – a widespread dangerous disease of humans and animals. Infection with listeriosis occurs by eating infected vegetables and animal products. Accurate and quick determination of the causative agent of infection is the key to prescribing an effective and adequate treatment. Of great practical interest is the species identification of bacteria of the genus *Listeria*, since there are cases of diseases in humans caused by *Listeria ivanovii*, therefore, it is important to accurately differentiate pathogenic and non-pathogenic *Listeria* species. One of the potentially important methods capable of solving these problems is the time-of-flight matrix-activated laser desorption/ionization MALDI-TOF, which is a convenient tool for analyzing microorganisms. At the same time, there are references in literary sources that the species identification of a bacterium of the genus *Listeria* by the MALDI-TOF method is not always correct. We suggested that this may be due to the influence of various factors, such as cultivation conditions, the composition of nutrient media, as well as the level of polymorphism of the strains taken for research.

Для корреспонденции:

Детушев Константин Владимирович, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Телефон: (4967) 31-1919

E-mail: detushevkv@obolensk.org

Статья поступила 17.06.2018 г., принята к печати 29.10.2018 г.

For correspondence:

Konstantin V. Detushev, junior researcher, collection cultures department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

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

Phone: (4967) 31-1919

E-mail: detushevkv@obolensk.org

The article was received 17.06.2018, accepted for publication 29.10.2018

In the present work, 35 strains of *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* and *L. seeligeri* obtained from the State collection of pathogenic microorganisms "GCPM-Obolensk" carried out a comparative analysis of the accuracy of identification using two methods of sample preparation – the method of direct deposition and the method of protein extraction with formic acid and acetonitrile. Regardless of the method of application, belonging to the genus *Listeria* was correctly established in all samples. However, the species identification during direct application was incorrect in nine experiments, and when using the extraction method – in three. We assume that this can be explained by the fact that the strains selected for work represent a diverse group of clinical isolates isolated in the territory of the Russian Federation.

Keywords: *Listeria*, mass spectrum, MALDI-TOF MS, identification, Microflex, MALDI-biotyper

For citation: Detushev K.V., Bogun A.G., Mukhina T.N., Solomentsev V.I. Comparing methods of direct application of biomass and protein extracts in identification of microorganisms of the genus *Listeria* by MALDI-TOF typing method. *Bacteriology*. 2018; 3(3): 28–33. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-28-33

Род *Listeria* представляет собой группу близкородственных грамположительных факультативных анаэробов, неспорообразующих палочковидных бактерий 0,5 мкм в ширину и 1–1,5 мкм в длину. В составе рода *Listeria* выделяют 17 видов: *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* и *L. grayi*, *L. marthii*, *L. recourtaiae*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. fleischmannii*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. weihenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia* и *L. booriae* [1, 2], из которых только *L. monocytogenes* и *L. ivanovii* считаются патогенными [3, 4]. Однако в нормативных документах РФ санитарно значимым среди бактерий рода *Listeria* считается вид *monocytogenes* [5]. Это связано с тем, что практически во всех случаях заболевание листериозами у человека вызвано *L. monocytogenes*, при употреблении зараженных пищевых продуктов [6], хотя известны у людей случаи заболеваний, вызванных *L. ivanovii* [1]. Вид *L. monocytogenes* разделяют на 13 серотипов, которые объединяют в четыре эволюционных линии: линия I (серотипы 1/2b, 3b, 4b, 4d и 4e), линия II (серотипы 1/2a, 1/2c, 3a и 3c), линия III (серотипы 4a и 4c) и линия IV (4a, 4b, 4c) [7, 8].

Времяпролетная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight) MALDI-TOF становится удобным инструментом для анализа микроорганизмов [9, 10]. Точность и скорость сбора данных с помощью MALDI-TOF делают этот метод потенциально важным для биологического контроля в области общественного здравоохранения, пищевой промышленности, скрининга проб крови и диагностики заболеваний бактериальной этиологии [11]. В литературных источниках встречаются упоминания о том, что не всегда видовая идентификация бактерий рода *Listeria* проходит корректно [12], например, из-за условий культивирования исследуемого микроорганизма [13].

В практике применяют несколько методов пробоподготовки бактериальной культуры для исследования методом MALDI-TOF [14]. Самым быстрым и простым методом пробоподготовки является прямое нанесение биомассы непосредственно на лунку мишени (чипа) для нанесения образцов (MSP-чипа). После высыхания образец исследуют на масс-спектрометре. Следующий метод пробоподготовки – метод экстракции белков с применением 70% этанола, 70% муравьиной кислоты и 100% ацетонитрила. Данная методика пробоподготовки применяется для неспорообразующих микроорганизмов. На первом этапе происходит приготовление бактериальной суспензии и инактивация бактериальных клеток 70% этанолом, далее, для разрушения клеточной стенки, бактериальные клетки обрабатывают 70% муравьи-

ной кислотой и для экстракции белков добавляют 100% ацетонитрил. Для спорообразующих микроорганизмов применяют метод экстракции белков с применением 80% трифторуксусной кислоты и 100% ацетонитрила. На первом этапе происходит приготовление бактериальной суспензии и инактивация бактериальных клеток с разрушением клеточной стенки 80% трифторуксусной кислотой, с последующей экстракцией белков 100% ацетонитрилом. После процедуры экстракции в обоих случаях экстракты наносят на лунку MSP-чипа и далее исследуют на масс-спектрометре.

Целью нашего исследования было изучить зависимость достоверности получаемых результатов от используемого метода нанесения анализируемого образца при идентификации микроорганизмов рода *Listeria* методом MALDI-TOF-типирования.

Материалы и методы

Штаммы и питательные среды

В работе использовали 35 штаммов рода *Listeria* видов *monocytogenes* – 17 штаммов, *innocua* – 8 штаммов, *welshimeri* – 4 штамма, *ivanovii* – 3 штамма, *grayi* – 2 штамма и *seeligeri* – 1 штамм, депонированных в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk». Полученные штаммы выращивали на плотной питательной среде №1 ГРМ производства ФБУН ГНЦ ПМБ в течение 20–24 ч при температуре (37 ± 1)°C.

Идентификация штаммов рода *Listeria* с помощью MALDI-TOF-MS

Идентификацию штаммов проводили двумя методами:

1) метод прямого нанесения – одну изолированную колонию захватывали одноразовой пластиковой микробиологической петлей и равномерно наносили на лунку мишени (чипа) для нанесения образцов, затем сверху покрывали 1 мкл раствора матрицы (α -циано-4-гидроксикоричной кислоты, растворенной в водном растворе 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты). Для каждой исследуемой единицы (колония, штамм) использовали 5 лунок для получения достоверного результата [14];

2) метод экстракции белков муравьиной кислотой и ацетонитрилом – одну изолированную колонию или часть колонии захватывали одноразовой пластиковой микробиологической петлей и переносили в чистую микроцентрифужную пробирку типа Eppendorf объемом 1,5 мл, содержащую 300 мкл ультрачистой воды (Milli-Q), и суспендировали. Затем к полученной суспензии добавляли 900 мкл 96% этанола и тщательно перемешивали на вортексе. После цен-

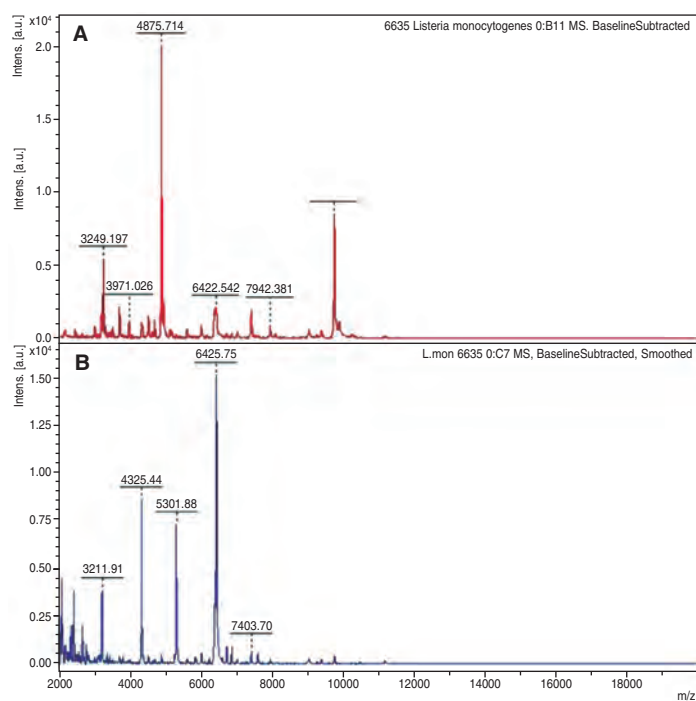


Рис. 1. А – спектр, полученный при исследовании белковых экстрактов *L. monocytogenes*. В – спектр, полученный при исследовании образца *L. monocytogenes*, непосредственно нанесенно на лунку MSP-чипа.

трифугирования в течение 2 мин при 13 000 об./мин (центрифуга Eppendorf MiniSpin), удаляли надосадочную жидкость. Для разрушения клеточной стенки к осадку добавляли 50 мкл 70% муравьиной кислоты и тщательно перемешивали. Затем для экстракции белка добавляли 50 мкл ацетонитрила. После центрифугирования в течение 2 мин при 13 000 об./мин 1 мкл супернатанта, содержащего белковый экстракт, наносили на лунку MSP-чипа и после высыхания образец покрывали 1 мкл раствора матрицы (α -циано-4-гидроксикоричной кислоты, растворенной в водном растворе 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты) [15].

Белковые масс-спектры получали с использованием масс-спектрометра Microflex LRF MALDI-TOF (Bruker) в линейном режиме, используя диапазон масс от 2000 до 20 000 Da. Перед каждым запуском идентификации прибор калибровался с использованием Bruker Bacterial Test Standard, содержащего в себе экстракт белков *E. coli* штамма DH5 α с добавлением двух высокомолекулярных белков РНКазы А и миоглобина.

Получение и интерпретация результатов

Создание протоколов исследования, снятие спектров и сравнение с базой масс-спектров проводили в автоматическом режиме с использованием программы MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonik), работающей совместно с flexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonik). После получения протокола исследования об уровне идентификации судили по величине коэффициен-

Таблица. Результаты идентификации спектров, полученных двумя методами пробоподготовки

№ ГКПМ-Оболенск	Вид в каталоге ГКПМ-Оболенск	Результаты идентификации MALDI-Biotyper			
		Метод прямого нанесения	Метод экстракции этанолом и муравьиной кислотой	Микроорганизм	Score Value
4810	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,118	1,879
4908	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,052	2,143
4910	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,854	2,364
5949	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,734	2,419
6634	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,903	2,412
6635	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,967	2,41
6636	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,131	2,351
6637	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,201	2,149
6638	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria innocua</i>	2,137	2,461
7271	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,029	2,551
7272	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria innocua</i>	2,088	2,529
7376	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,833	2,423
7377	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,314	2,48
7378	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria innocua</i>	1,73	2,337
7495	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,783	2,554
7496	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,906	2,523
7747	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,872	2,579
6434	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>	2,405	2,22
6643	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>	1,93	2,534
7274	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>	2,394	2,627
7379	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>	2,062	2,597
7380	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>	2,175	2,567
7497	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>	1,749	2,561
7498	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>	2,116	2,518
7748	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>	2,174	2,605
4911	<i>Listeria welshimeri</i>	<i>Listeria welshimeri</i>	<i>Listeria welshimeri</i>	1,835	2,144
7382	<i>Listeria welshimeri</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria welshimeri</i>	1,931	2,559
7383	<i>Listeria welshimeri</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria welshimeri</i>	1,862	2,466
7499	<i>Listeria welshimeri</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria welshimeri</i>	1,901	2,317
7273	<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	1,993	2,563
7381	<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	1,888	2,613
7759	<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	2,223	2,513
6642	<i>Listeria grayi</i>	<i>Listeria grayi</i>	<i>Listeria grayi</i>	1,969	1,802
7384	<i>Listeria grayi</i>	<i>Listeria grayi</i>	<i>Listeria grayi</i>	2,297	2,441
7386	<i>Listeria seeligeri</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria seeligeri</i>	1,9	2,262

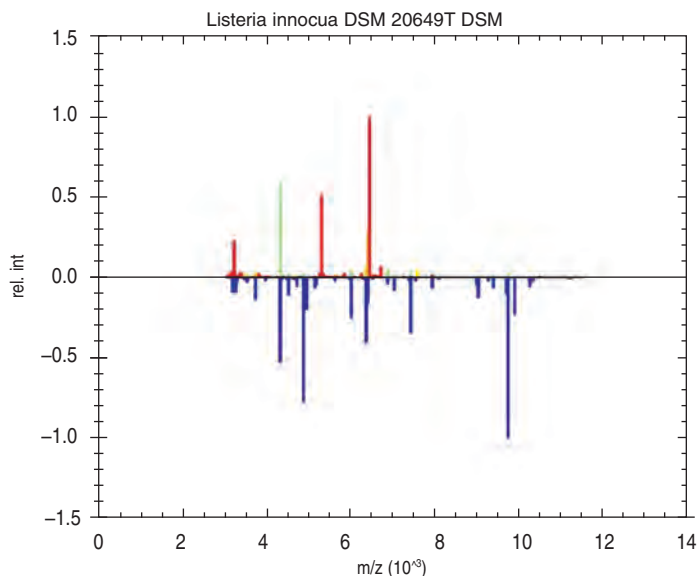


Рис. 2. Сравнение спектра из базы Bruker со спектром, полученным при исследовании образца *L. innocua*, непосредственно нанесенного на лунку MSP-чипа.

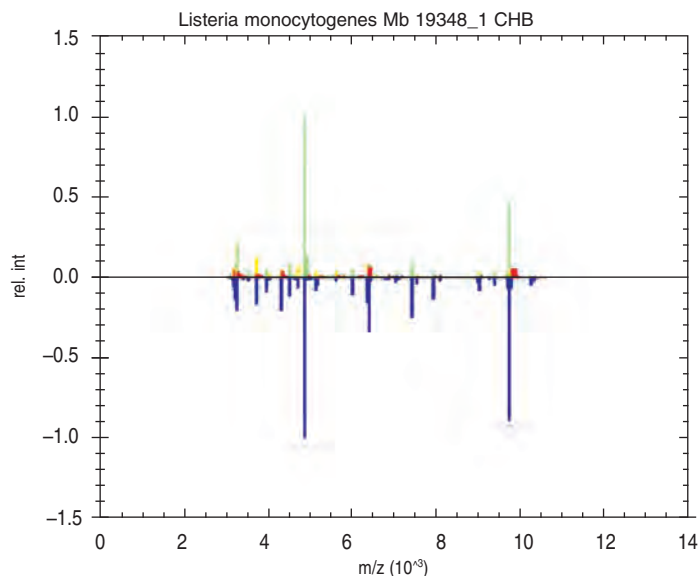


Рис. 3. Сравнение спектра из базы Bruker со спектром, полученным при исследовании белковых экстрактов *L. monocytogenes*.

та соответствия (Score Value). Согласно руководству пользователя MALDI Biotyper, интервал значения величины Score Value от 1,7 до 2,0 характеризует возможную идентификацию до рода, значение величины Score Value выше 2,0 свидетельствует о родовой идентификации, значение величины Score Value выше 2,3 соответствует достоверной идентификации до вида [16].

Результаты исследования

Проведено исследование 35 штаммов, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* и *L. seeligeri*, полученных из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk». При идентификации использовали два метода пробоподготовки: прямое нанесение части бактериальной колонии на лунку MSP-чипа и приготовление белкового экстракта с применением муравьиной кислоты и ацетонитрила. В ходе работы было проведено сравнение достоверности получаемых результатов идентификации при применении двух описанных методов нанесения исследуемых образцов.

При сравнении спектров, полученных при использовании разных методов нанесения исследуемых культур микроорганизмов, установлено, что спектры, полученные при исследовании белковых экстрактов (рис. 1А), во всех экспериментах характеризуются большим количеством регистрируемых пиков с меньшим количеством шумов по сравнению со спектрами, полученными при исследовании образцов, нанесенных непосредственно на лунку MSP-чипа (рис. 1В). В образцах, полученных при использовании процедуры экстракции, значительно улучшается идентификация белковых спектров с высокой молекулярной массой.

Также при сравнении получаемых спектров со спектрами из базы спектров Bruker спектры, полученные при исследовании образцов, непосредственно нанесенных на лунку MSP-чипа, показывали меньшее число совпадений пиков

(рис. 2) по сравнению со спектрами, полученными при исследовании белковых экстрактов (рис. 3). Зеленым обозначены пики полученного спектра, которые точно совпадают с соответствующими пиками референсного спектра из базы Bruker. Желтым обозначены пики полученного спектра, которые имеют небольшое смещение относительно соответствующих пиков референсного спектра из базы Bruker. Красным обозначены пики полученного спектра, которые имеют значительное смещение относительно соответствующих пиков референсного спектра или не имеют соответствующих пиков референсного спектра из базы Bruker.

Независимо от метода нанесения во всех экспериментах была получена надежная родовая идентификация (таблица). Однако видовая идентификация при прямом нанесении была некорректна в девяти экспериментах из тридцати пяти (выделено желтым), при этом величина значения Score Value только в одном случае была равна 2,2 (выделено красным), что характеризуется как видовая идентификация, в остальных случаях величина Score Value была ниже 1,9, что характеризуется как родовая идентификация. При применении метода экстракции в трех экспериментах из тридцати пяти видовая идентификация была некорректна (выделено зеленым), при этом величина значения Score Value во всех трех случаях превышала значение 2,3, что, в свою очередь, соответствует надежной видовой идентификации. При дальнейшем исследовании некорректно идентифицированных образцов было приготовлено по 10 экстрактов из каждого штамма и вновь идентифицировано, как описано выше. В результате около 20% вновь исследованных образцов показали некорректную видовую идентификацию. Также было отмечено, что при прямом нанесении некорректная идентификация наблюдалась на всех видах рода *Listeria*, тогда как при исследовании белковых экстрактов только в случаях идентификации *Listeria monocytogenes* на первое место в рейтинге идентификации выходил вид *innocua*. Однако на втором месте всегда был вид *monocytogenes*, со значением Score Value 2,3 и выше, характерным для надежной видовой идентификации.

Обсуждение

Метод MALDI-масс-спектрометрии, реализованный в аппаратно-программном комплексе MALDI Biotyper (Bruker Daltonik), быстро и с высокой степенью достоверности позволяет идентифицировать бактерии рода *Listeria* до уровня вида при использовании метода экстракции белков этанолом, муравьиной кислотой и ацетонитрилом.

Несмотря на то что в нормативных документах РФ санитарно значимым видом среди бактерий рода *Listeria* считается вид *monocytogenes* [5], у людей известны случаи заболеваний, вызванных *L. ivanovii* [1]. В связи с этим высокая степень достоверности дифференциации патогенных представителей рода *Listeria* от непатогенных при небольших временных (5–7 мин на образец) и на порядок меньших финансовых (по сравнению с классическими методами идентификации) затратах делает метод MALDI одним из наиболее эффективных инструментов при лабораторном исследовании пищевых продуктов животного происхождения. Также возможно применение данного метода при исследовании материала от больных листериозом и при исследовании случаев пищевых инфекций, вызываемых представителями рода *Listeria*, так как при сравнительно низких финансовых и временных затратах метода появляется возможность провести быстрое исследование большого количества проб.

Комплекс MALDI Biotyper в высокой степени применим при скрининговых работах по дифференциации непатогенных листерий, которые рассматриваются как резервуар детерминант резистентности и потенциального изменения физиологических свойств, с возможностью передачи их патогенным листериям путем горизонтального переноса [17], а также при индикации патогенных листерий в пищевых продуктах и другого исследуемого материала.

В литературе имеется противоречивая информация относительно возможностей идентификации бактерий рода *Listeria* методом MALDI. Вероятно, на возможность провести идентификацию на уровне вида оказывают влияние такие факторы, как условия культивирования, состав питательных сред, а также уровень полиморфизма штаммов, взятых для исследований. Возможно, что в тех случаях, когда исследования проводятся на типовых штаммах, вероятность успешной видовой идентификации оказывается значительно выше. В настоящем исследовании отобранные для проведения работ штаммы представляют разнородную группу клинических изолятов, выделенных на территории Российской Федерации. Вероятно, именно с этим связаны сложности, возникшие при их идентификации.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках НИР 062 «Геномный, протеомный и метагеномный анализ штаммов, депонированных в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур («ГКПМ-Оболensk»).

Литература

1. den Bakker HC, Cummings CA, Ferreira V, Vatta P, Orsi RH, Degoricija L, et al. Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is

characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. BMC Genomics. 2010 Dec 2;11:688. DOI: 10.1186/1471-2164-11-688

2. den Bakker HC, Warchocki S, Wright EM, Allred AF, Ahlstrom C, Manuel CS, et al. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. Int J Syst Evol Microbiol. 2014 Jun;64(Pt 6):1882-9. DOI: 10.1099/ijls.0.052720-0

3. Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. J Med Microbiol. 2006 Jun;55(Pt 6):645-59. DOI: 10.1099/jmm.0.46495-0

4. Robinson RK, Batt CA, Patel PD. (editors). Encyclopedia of Food Microbiology. San Diego, CA: Academic Press, 2000.

5. Метод выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes* в молоке и молочных продуктах на основе гибридизационного ДНК-РНК анализа: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011, 12 с.

6. Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. Microbes Infect. 2007 Aug;9(10):1236-43. DOI: 10.1016/j.micinf.2007.05.011

7. Rasmussen OF, Skouboe P, Dons L, Rossen L, Olsen JE. *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. Microbiology. 1995 Sep;141 (Pt 9):2053-61. DOI: 10.1099/13500872-141-9-2053

8. Ward TJ, Ducey TF, Usgaard T, Dunn KA, Bielawski JP. Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. Appl Environ Microbiol. 2008 Dec;74(24):7629-42. DOI: 10.1128/AEM.01127-08

9. Krishnamurthy T, Ross PL. Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. Rapid Commun Mass Spectrom. 1996;10(15):1992-6.

10. Saenz AJ, Petersen CE, Valentine NB, Gantt SL, Jarman KH, Kingsley MT, Wahl KL. Reproducibility of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for replicate bacterial culture analysis. Rapid Commun Mass Spectrom. 1999;13(15):1580-5.

11. Barbudde SB, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domann E, Chakraborty T, Hain T. Rapid Identification and Typing of *Listeria* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. Appl Environ Microbiol. 2008 Sep;74(17):5402-7. DOI: 10.1128/AEM.02689-07

12. Ojima-Kato T, Yamamoto N, Takahashi H, Tamura H. Matrix-assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Can Precisely Discriminate the Lineages of *Listeria monocytogenes* and Species of *Listeria*. PLoS One. 2016 Jul 21;11(7):e0159730. DOI: 10.1371/journal.pone.0159730

13. Jadhav S, Gulati V, Fox EM, Karpe A, Beale DJ, Seviour D, Bhavne M, Palombo EA. Rapid identification and source-tracking of *Listeria monocytogenes* using MALDI-TOF mass spectrometry. Int J Food Microbiol. 2015 Jun 2;202:1-9. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.023

14. Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I–II групп патогенности. Методические рекомендации. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015, 19 с.

15. Alispahic M, Hummel K, Jandreski-Cvetkovic D, Nöbauer K, Razzazi-Fazeli E, Hess M, Hess C. Species-specific identification and differentiation of *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral matrix-associated laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry analysis J Med Microbiol. 2010 Mar;59(Pt 3):295-301. DOI: 10.1099/jmm.0.016576-0

16. Alispahic M, Christensen H, Hess C, Razzazi-Fazeli E, Bisgaard M, Hess M. MALDI-TOF mass spectrometry confirms clonal lineages of *Gallibacterium anatis* between chicken flocks. Vet Microbiol. 2012 Nov 9;160(1-2):269-73. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.05.032

17. Katharios Lanwermeier S, RakicMartinez M, Elhanafi D, Ratani S, Tiedje J, Kathariou S. Coselection of cadmium and benzalkonium chloride resistance in conjugative transfers from nonpathogenic *Listeria* spp. to other *Listeriae*. *Appl Environ Microbiol*. 2012 Nov;78(21):7549-56. DOI: 10.1128/AEM.02245-12
18. Cummins AJ, Fielding AK, McLauchlin J. *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. *J Infect*. 1994 Jan;28(1):89-91.
19. Guillet C, JoinLambert O, Le Monnier A, Leclercq A, Méchaï F, MamzerBruneel M, et al. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg Infect Dis*. 2010 Jan; 16(1):136-8. DOI: 10.3201/eid1601.091155.
14. Use of time-of-flight mass spectrometry with matrix-activated laser desorption / ionization (MALDI-ToF MS) for indication and identification of pathogenicity group I-II pathogens. Guidelines. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology, 2015, 19 p. (In Russian).
15. Alispahic M, Hummel K, Jandreski-Cvetkovic D, Nöbauer K, Razzazi-Fazeli E, Hess M, Hess C. Species-specific identification and differentiation of *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral matrix-associated laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry analysis *J Med Microbiol*. 2010 Mar;59(Pt 3):295-301. DOI: 10.1099/jmm.0.016576-0
16. Alispahic M, Christensen H, Hess C, Razzazi-Fazeli E, Bisgaard M, Hess M. MALDI-TOF mass spectrometry confirms clonal lineages of *Gallibacterium anatis* between chicken flocks. *Vet Microbiol*. 2012 Nov 9;160(1-2):269-73. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.05.032

References

1. den Bakker HC, Cummings CA, Ferreira V, Vatta P, Orsi RH, Degoricija L, et al. Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. *BMC Genomics*. 2010 Dec 2;11:688. DOI: 10.1186/1471-2164-11-688
2. den Bakker HC, Warchocki S, Wright EM, Allred AF, Ahlstrom C, Manuel CS, et al. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014 Jun;64 (Pt 6):1882-9. DOI: 10.1099/ijs.0.052720-0
3. Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol*. 2006 Jun;55 (Pt 6): 645-59. DOI: 10.1099/jmm.0.46495-0
4. Robinson RK, Batt CA, Patel PD. (editors). *Encyclopedia of Food Microbiology*. San Diego, CA: Academic Press, 2000.
5. Method of detection and determination of bacteria *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products based on hybridization DNA-RNA analysis. Guidelines. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology, 2011, 12 c. (In Russian).
6. Swaminathan B, Gerner-Smith P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect*. 2007 Aug;9(10):1236-43. DOI: 10.1016/j.micinf.2007.05.011
7. Rasmussen OF, Skouboe P, Dons L, Rossen L, Olsen JE. *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. *Microbiology*. 1995 Sep; 141 (Pt 9):2053-61. DOI: 10.1099/13500872-141-9-2053
8. Ward TJ, Ducey TF, Usgaard T, Dunn KA, Bielawski JP. Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Dec;74(24):7629-42. DOI: 10.1128/AEM.01127-08
9. Krishnamurthy T, Ross PL. Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1996;10(15):1992-6.
10. Saenz AJ, Petersen CE, Valentine NB, Gantt SL, Jarman KH, Kingsley MT, Wahl KL. Reproducibility of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for replicate bacterial culture analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1999;13(15):1580-5.
11. Barbudde SB, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domann E, Chakraborty T, Hain T. Rapid Identification and Typing of *Listeria* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Sep;74(17):5402-7. DOI: 10.1128/AEM.02689-07
12. Ojima-Kato T, Yamamoto N, Takahashi H, Tamura H. Matrix-assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Can Precisely Discriminate the Lineages of *Listeria monocytogenes* and Species of *Listeria*. *PLoS One*. 2016 Jul 21;11(7):e0159730. DOI: 10.1371/journal.pone.0159730
13. Jadhav S, Gulati V, Fox EM, Karpe A, Beale DJ, Sevier D, Bhavne M, Palombo EA. Rapid identification and source-tracking of *Listeria monocytogenes* using MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Food Microbiol*. 2015 Jun 2;202:1-9. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.023

Информация об авторах:

Богун Александр Геннадьевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0000
 E-mail: bogun62@mail.ru

Мухина Татьяна Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 31-1919
 E-mail: mukhina@obolensk.org

Соломенцев Виктор Иванович, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 31-1919
 E-mail: solomentsev@obolensk.org

Information about authors:

Alexander G. Bogun, PhD (Biology), head of microbial collection 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) 36-0000
 E-mail: bogun62@mail.ru

Tatyana N. Mukhina, PhD (Biology), senior researcher of the microbial collection 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) 36-1919
 E-mail: mukhina@obolensk.org

Viktor I. Solomentsev, junior researcher of microbial collection 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) 36-1919
 E-mail: solomentsev@obolensk.org

Опыты по повышению стабильности крови бараньей дефибрированной

С.Г.Марданлы^{1,2}, Н.В.Бахилина¹, Я.В.Мишуткина¹, М.А.Котляр¹

¹ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет», Орехово-Зуево, Московская область, Российская Федерация;

²ЗАО «ЭКОлаб», Электрогорск, Московская область, Российская Федерация

В работе представлены результаты экспериментов по увеличению сроков годности крови бараньей дефибрированной за счет введения в состав реагента готовых консервантов крови и отдельных их компонентов, разработаны практические рекомендации по оптимизации этого параметра, предложено инициировать процедуру актуализации соответствующих нормативных документов.

Ключевые слова: кровь баранья дефибрированная, консерванты крови, хранение

Для цитирования: Марданлы С.Г., Бахилина Н.В., Мишуткина Я.В., Котляр М.А. Опыты по повышению стабильности крови бараньей дефибрированной. Бактериология. 2018; 3(3): 34–37. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-34-37

Experiences to improve the stability of the defibrinated lamb blood

S.G.Mardanly^{1,2}, N.V.Bahilina¹, Ya.V.Mishutkina¹, M.A.Kotlyar¹

¹State Humanitarian and Technological University, Orekhovo-Zuyevo, Moscow region, Russian Federation;

²CJSC EKOLab, Elektrogorsk, Moscow region, Russian Federation

The paper presents the results of experiments to increase the shelf life of defibrinated lamb blood by introducing ready-made blood preservatives and their individual components into the reagent, practical recommendations for optimizing this parameter have been developed, initiating the procedure for updating relevant regulatory documents have been suggested.

Keywords: defibrinated lamb blood, blood preservatives, storage

For citation: Mardanly S.G., Bahilina N.V., Mishutkina Ya.V., Kotlyar M.A. Experiences to improve the stability of the defibrinated lamb blood. Bacteriology. 2018; 3(3): 34–37. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-34-37

Кровь баранья дефибрированная – реагент, широко используемый в микробиологических лабораториях при приготовлении питательных сред как для их обогащения при выращивании особо требовательных к составу сред микроорганизмов, так и для приготовления сред, позволяющих дифференцировать микроорганизмы по наличию или отсутствию у них гемолитической активности.

Для последнего исключительно важна устойчивость эритроцитов к спонтанному гемолизу в реагенте, хранящемся до своего использования, а также способность обеспечивать при добавлении в питательную среду выявление гемолитических свойств микроорганизмов. То есть характеристиками, определяющими возможность использования крови бараньей как диагностического реагента, являются полное от-

сутствие спонтанного гемолиза на момент исследования и способность обеспечивать рост тест-микроорганизмов на питательной среде, приготовленной с его использованием.

Реагент, выпускаемый ЗАО «ЭКОлаб», в соответствии с ТУ 9389-073-70423725-2007 имеет гарантированный срок хранения до использования 14 сут, что существенно снижает его потребительские характеристики сравнительно с аналогичными продуктами других производителей, гарантированный срок хранения которых составляет 56 сут.

Методики увеличения сроков хранения крови животных и ее компонентов практически не описаны в литературе. Поэтому при планировании экспериментов мы опирались на литературные данные по технологии консервирования донорской крови человека.

Для корреспонденции:

Марданлы Сейфаддин Гашимович, доктор медицинских наук, академик АМТН, профессор кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет», президент и директор по науке ЗАО «ЭКОлаб»

Адрес: 142530, Московская область, Электрогорск, ул. Буденного, 1

Телефон: (49643) 3-17-45

E-mail: ekolab-president@mail.ru

Статья поступила 19.06.2018 г., принята к печати 29.10.2018 г.

For correspondence:

Seifaddin G. Mardanly, MD, PhD, DSc, professor, academician AMTS, Professor of the Department of pharmacology, State Humanitarian and Technological University, President and Director of Science CJSC "EKOLab"

Address: 1 Budyonny str., Elektrogorsk, Moscow region, 142530, Russian Federation

Phone: (49643) 3-17-45

E-mail: ekolab-president@mail.ru

The article was received 19.06.2018, accepted for publication 29.10.2018

В современной трансфузиологии для консервирования крови чаще всего используются многокомпонентные консерванты на основе цитрата натрия. Помимо цитрата натрия, консервирующие растворы содержат глюкозу, аденин, дифосфоглицерофосфаты (1,3-ДФГ, 2,3-ДФГ), L-аминокислоты, аденозинмонофосфат (АМФ) или циклический АМФ (цАМФ), фосфатные буферные растворы и т.д. Подобное сочетание компонентов позволяет уменьшить количество применяемого цитрата, снизить его токсические эффекты, стабилизировать pH крови, поддержать высокий уровень гликолиза в течение всего срока хранения [1–4]. Однако возможность использования консервированной таким образом крови как компонента питательных сред у многих потребителей вызывает вполне обоснованный скепсис, учитывая достаточно сложный механизм гемолиза эритроцитов в питательных средах в результате действия гемолитических ферментов микроорганизмов.

Целью настоящего исследования была оценка возможности увеличения сроков годности крови бараньей дефибринированной нашего производства за счет введения в состав реагента как готовых консервантов крови, используемых в современной трансфузиологии, так и отдельных их компонентов. Кроме того, представлялось целесообразным оценить возможность использования осмотической устойчивости эритроцитов (минимальной концентрацией гипотонического раствора натрия хлорида, вызывающего в течение 3 ч гемолиз всех эритроцитов крови, помещенных в этот раствор) и такого показателя, как гематокрит, для прогнозирования гемолитической стабильности эритроцитов.

Материалы и методы

Использовали реагент собственного производства «Кровь баранья дефибринированная для питательных сред стерильная» по ТУ 9389-073-70423725-2007, приготовленный по регламенту №ПР-073-07.

В качестве стабилизирующих добавок были использованы:

1) консервант крови «ЦФДА-1», в состав которого входит лимонная кислота (безводная), натрия цитрата дигидрат, натрия дигидрофосфата моногидрат, декстрозы моногидрат, аденин, вода для инъекций;

2) консервант крови «САГМ», в состав которого входят натрия хлорид, аденин, глюкоза, маннитол, вода для инъекций (оба раствора брали из мешков для забора крови производства ЗАО «Дельрус»);

3) препарат для внутривенных инъекций «Глюкоза буфус», ЗАО «Производственная фармацевтическая компания Обновление» (раствор глюкозы 40%);

4) аналогичный раствор с добавкой аденина «ООО Кемикал Лайн», приготовленный на воде, очищенной по ФС 2.2.0020.15, стерилизованный при 1,1 атм, в течение 30 мин.

Стабилизаторы добавляли к реагенту, профильтрованному через стерильный трехслойный марлевый фильтр, и тщательно перемешивали, избегая образования пены:

- ЦФДА-1 – из расчета 63 мл на 450 мл крови;
- САГМ – из расчета 100 мл на 450 мл крови;
- раствор глюкозы – из расчета на получение конечной концентрации глюкозы 1%;

Таблица 1. Устойчивость к гемолизу эритроцитов в образцах крови бараньей, хранившихся при 2–8°C

Исследуемый вариант реагента	Наличие гемолиза на срок хранения при 2–8°C, сут						
	0	7	14	28	35	42	56
1-й контрольный (реагент производства ЗАО «ЭКОлаб» без добавок)	–	–	–	+	+	+	+
2-й контрольный (реагент производства E&O Laboratories Ltd)	–	–	–	–	–	+	+
1-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора ЦФДА-1)	–	–	–	–	+	+	+
2-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора САГМ)	–	–	–	–	–	–	–
3-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора глюкозы)	–	–	–	–	–	–	–
4-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора глюкозы и аденина)	–	–	–	–	–	–	–

«–» гемолиз отсутствует, «+» частичный гемолиз, «++» гемолиз.

Таблица 2. Показатель осмотической устойчивости эритроцитов в образцах крови бараньей, хранившихся при 2–8°C

Исследуемый вариант реагента	Значения показателя на ... суток хранения при 2–8°C						
	0	7	14	28	35	42	56
1-й контрольный (реагент производства ЗАО «ЭКОлаб» без добавок)	0,55	0,65	0,65	0,7	Не исследовались**		
2-й контрольный (реагент производства E&O Laboratories Ltd)	Нет данных*	0,6	0,6	0,65	0,65	0,7	0,7
1-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора ЦФДА-1)	0,55	0,6	0,6	0,65	0,65	Не исследовались**	
2-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора САГМ)	0,55	0,65	0,65	0,65	0,65	Не исследовались**	
3-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора глюкозы)	0,5	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,6
4-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора глюкозы и аденина)	0,5	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,6

*Исходная осмотическая устойчивость препарата E&O Laboratories Ltd не известна (показатель отсутствует в паспорте);
**оценка не проводилась по причине полного гемолиза.

Таблица 3. Показатель гематокрита (%) в образцах крови бараньей, хранившихся при 2–8°C

Исследуемый вариант реагента	Значения показателя на ... суток хранения при 2–8°C						
	0	7	14	28	35	42	56
1-й контрольный (реагент производства ЗАО «ЭКОлаб» без добавок)	30	30	30	30	Не исследовались		
2-й контрольный (реагент производства E&O Laboratories Ltd)	30	32	32	32	32	32	30
1-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора ЦФДА-1)	30	30	30	30	30	30	27
2-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора САГМ)	30	30	30	30	30	30	27
3-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора глюкозы)	30	30	30	30	30	30	27
4-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора глюкозы и аденина)	30	30	30	30	30	30	27

• раствор глюкозы с аденином – из расчета на получение конечных концентраций глюкозы и аденина 1% и 0,003% соответственно.

В качестве контроля использовали реагент без стабилизаторов.

В качестве референс-реагента использовали аналогичный реагент фирмы E&O Laboratories Ltd (Шотландия).

Образцы всех реагентов помещали на хранение при 2–8°C.

Непосредственно после приготовления, а также через 7, 14, 28, 35 и 42 сут хранения все образцы оценивали по наличию в них спонтанного гемолиза и по характеру роста тест-штаммов стафилококка и стрептококка на средах, приготовленных с использованием этих реагентов. Оценку проводили по методикам, изложенным в ТУ 9389-073-70423725-2007. Гематокрит и осмотическую устойчивость эритроцитов оценивали по методикам, изложенным в руководстве «Лабораторные методы диагностики» [5].

Результаты исследования

Исследование влияния хранения на основные характеристики экспериментальных и контрольных образцов крови бараньей показало сохранность ростовых характеристик питательных сред, приготовленных из этих образцов на протяжении всего срока хранения, вплоть до появления в них частичного гемолиза (из полностью гемолизированных образцов питательные среды не готовились).

Результаты оценок устойчивости эритроцитов испытуемых образцов к гемолизу представлены в таблице 1.

На каждый срок исследовано не менее 5 образцов каждого варианта. Во всех параллельных исследованиях были получены совпадающие результаты.

Как следует из приведенных в таблице 1 данных, добавка в препарат крови глюкозы (образец 3) и глюкозы с аденином (образец 4) обеспечила полную гемолитическую стабильность вплоть до 42 сут хранения, т.е. до срока, на котором в контрольном коммерческом препарате уже был отмечен частичный гемолиз. Одинаковый стабилизирующий эффект добавок глюкозы и глюкозы с аденином позволяет рекомендовать для практического использования только 1% раствор глюкозы.

Представляло интерес также сопоставление исходных значений и динамики значений показателей осмотической устойчивости эритроцитов и гематокрита при хранении образцов со сроками наступления в них гемолиза.

Значения показателей устойчивости эритроцитов и гематокрита (исходные и в процессе хранения образцов) приведены в таблицах 2 и 3.

Как следует из приведенных в таблицах 2 и 3 данных, ни в исходных значениях обоих показателей, ни в последующей их динамике при хранении не удалось выявить существенных различий между всеми исследованными образцами. Можно отметить лишь тенденцию к более высокой осмотической стабильности (и исходной, и в процессе хранения) реагента ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой глюкозы и глюкозы с аденином (образцы 3 и 4), совпадающую с более поздним появлением в них признаков гемолиза. Однако доказать статистическую значимость этой тенденции из-за столь

малых отличий и по причине недостаточных данных не удалось, что еще не позволяет рекомендовать этот показатель для прогнозирования гемолитической устойчивости эритроцитов в производимом продукте.

Показатель гематокрита в этом отношении оказался еще менее информативен и может расцениваться лишь как необходимая характеристика постоянства концентрации эритроцитов в продукте.

Выводы и предложения

1. Введение в коммерческий препарат крови бараньей дефибринированной 1% глюкозы или 1% глюкозы с 0,003% аденина позволило обеспечить полное отсутствие гемолиза в препарате до 42 сут хранения при 2–8°C.

2. Частичный гемолиз эритроцитов, выявляемый на 56-е сутки хранения, не препятствует использованию реагента для приготовления питательных сред.

3. Возможность использования осмотической устойчивости эритроцитов в свежеприготовленном реагенте для прогнозирования сроков гемолиза при хранении не доказана.

4. Показатель гематокрита может быть использован как показатель качества только для характеристики постоянства содержания эритроцитов в выпускаемом реагенте.

5. Целесообразно продолжить исследования связи гемолитической устойчивости эритроцитов при хранении реагента с исходным значением их осмотической устойчивости.

6. Целесообразно включить показатель гематокрита в число показателей качества реагента как характеристику исходного содержания в нем эритроцитов.

7. Рекомендовать инициацию процедуры актуализации нормативных документов, входящих в регистрационное досье для включения в его состав 1% глюкозы, изменения гарантированного срока хранения реагента до 56 сут и включения гематокрита в число показателей качества реагента.

Литература

1. Кузьмина ТВ, Пацелова ЛП. Сравнительный анализ применения эритроцитной массы, заготовленной с гемоконсервантом CPDA-1 и эритроцитной взвеси, полученной с применением ресуспендирующего раствора SAGM. Трансфузиология. 2004;5(3):100-3.
2. Рагимов АА, Еременко АА, Никифоров ЮВ. Трансфузиология в реаниматологии. М.: МИА; 2005, 784 с.
3. Трансфузиология: национальное руководство. Под ред. проф. А.А.Рагимова. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2015, 1184 с.
4. Четкин АВ, Макеев АБ, Солдатенков ВЕ, Григорьян МШ. Совершенствование технологий заготовки эритроцитных компонентов в службе крови Российской Федерации. Медицина экстремальных ситуаций. 2013;3(45):63-9.
5. Степанов ЮМ. Лабораторные методы диагностики. Исследование крови. Абакан: Хакасский филиал ФГОУ ВПО «КрасГАУ»; 2004, 55 с.

References

1. Kuz'mina TV, Patselova LP. Sravnitel'nyi analiz primeneniya eritrotsitnoi massy, zagotovlennoi s gemokonservantom CPDA-1 i eritrotsitnoi vzvezi, poluchennoi s primeneniem resuspendiruyushchego rastvora SAGM. Transfuziologiya. 2004; 5(3):100-3. (In Russian).

2. Ragimov AA, Eremenko AA, Nikiforov YuV. Transfuziologiya v reanimatologii. Moscow: "MIA" Publ.; 2005, 784 p. (In Russian).
3. Transfuziologiya: natsional'noe rukovodstvo. Edited by A.A.Ragimov. Moscow: "GEOTAR-Media" Publ.; 2015, 1184 p. (In Russian).
4. Chechetkin AV, Makeev AB, Soldatenkov VE, Grigoryan MS. Perfecting the technologies of red blood banking in blood supply service in Russian Federation. Medicine of Extreme Situations. 2013;3(45):63-9. (In Russian).
5. Stepanov YuM. Laboratornye metody diagnostiki. Issledovanie krovi. Abakan, 2004, 55 p. (In Russian).

Информация об авторах:

Бахилина Наталья Владимировна, начальник НПО «Иммунология» ЗАО «ЭКОлаб»
Адрес: 142530, Московская область, Электрогорск, ул. Буденного, 1
Телефон: (800) 333-1745
E-mail: ekolab-bahilina@mail.ru

Мишуткина Яна Владимировна, кандидат биологических наук, директор НПО «Иммунология» ЗАО «ЭКОлаб»
Адрес: 142530, Московская область, Электрогорск, ул. Буденного, 1
Телефон: (800) 333-1745
E-mail: ekolab-mishutkina@mail.ru

Котляр Марина Анатольевна, кандидат биологических наук, заместитель начальника ОБТК ЗАО «ЭКОлаб»
Адрес: 142530, Московская область, Электрогорск, ул. Буденного, 1
Телефон: (800) 333-1745
E-mail: ekolab-kotlyar@mail.ru

Information about co-authors:

Natalia V. Bahilina, Head of the NGO «Immunology» CJSC «EKOLab»
Address: 1 Budyonny str., Elektrogorsk, Moscow region, 142530, Russian Federation
Phone: (800) 333-1745
E-mail: ekolab-bahilina@mail.ru

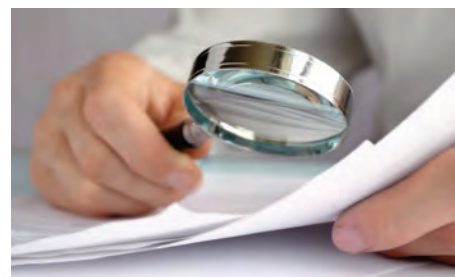
Yana V. Mishutkina, PhD (Biological Sciences), Director of Scientific and Production Association «Immunology» CJSC «EKOLab»
Address: 1 Budyonny str., Elektrogorsk, Moscow region, 142530, Russian Federation
Phone: (800) 333-1745
E-mail: ekolab-mishutkina@mail.ru

Marina A. Kotlyar, PhD (Biological Sciences), Deputy Head of the OPF CJSC «EKOLab»
Address: 1 Budyonny str., Elektrogorsk, Moscow region, 142530, Russian Federation
Phone: (800) 333-1745
E-mail: ekolab-kotlyar@mail.ru

Оральные бактерии могут помочь судебным-медицинским экспертам оценить время с момента смерти

Точное определение времени, прошедшего с момента смерти, является важным аспектом судебной медицины и судебной практики. Новые исследования показывают, что это может быть достигнуто путем изучения изменений в бактериальных сообществах рта, которые возникают после смерти.

Adserias-Garriga J, Quijada NM, Hernandez M, Rodríguez Lázaro D, Steadman D, Garcia-Gil LJ.
Dynamics of the oral microbiota as a tool to estimate time since death.
Mol Oral Microbiol. 2017 Dec;32(6):511-516. DOI: 10.1111/omi.12191.



Фосфомицин как потенциальное лекарство для лечения системных инфекций: популяционная фармакокинетическая модель для моделирования множественных режимов дозирования

Новое исследование показывает, что лекарственный фосфомицин может быть эффективным для лечения множественных лекарственно-устойчивых бактериальных инфекций. В большинстве европейских стран пероральная композиция одобряется только как однократная доза 3 г для лечения неосложненного цистита; однако исследование Pharmacology Research & Perspectives показало, что режим дозирования 6–12 г в день, разделенный на 3 дозы, необходим для лечения системных бактериальных инфекций, резистентных к нескольким лекарственным средствам.



Ortiz Zacañas NV, Dijkmans AC, Burggraaf J, Mouton JW, Wilms EB, van Nieuwkoop C, et al.
Fosfomicin as a potential therapy for the treatment of systemic infections: a population pharmacokinetic model to simulate multiple dosing regimens.
Pharmacol Res Perspect. 2018 Feb;6(1). DOI: 10.1002/prp2.378

Bdellovibrio bacteriovorus – уникальный биологический объект с возможной перспективой использования

П.В.Слукин, З.М.Ермоленко, Э.А.Светоч, Н.К.Фурсова

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

Обзор содержит сведения об истории открытия, свойствах и таксономическом положении хищных бактерий вида *Bdellovibrio bacteriovorus*. У *B. bacteriovorus* описаны две формы существования: зависимая от хозяина – хищническая, и сапротрофная, когда микроб растет и делится вне зависимости от клеток хозяина. Спектр бактериолитической активности *B. bacteriovorus* очень широк. Потенциально он включает практически все грамтрицательные бактерии. Отсутствие патогенности *B. bacteriovorus* для эукариотических организмов было продемонстрировано *in vivo* на ряде животных моделей. Показана возможность использования *B. bacteriovorus* в качестве альтернативного антибактериального агента против *Salmonella enterica*, *Aeromonas hydrophila*, *Proteus penneri*, *Pseudomonas glycinea*, *Pseudomonas tolaasii*.

Ключевые слова: *Bdellovibrio bacteriovorus*, хищные бактерии, бактериолитическое действие, альтернативный антибактериальный агент

Для цитирования: Слукин П.В., Ермоленко З.М., Светоч Э.А., Фурсова Н.К. *Bdellovibrio bacteriovorus* – уникальный биологический объект с возможной перспективой использования. Бактериология. 2018; 3(3): 38–45. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-38-45

Bdellovibrio bacteriovorus is the unique biological object with possible perspective for use

P.V.Slugin, Z.M.Ermolenko, E.A.Svetoch, N.K.Fursova

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

The review contains information concerning the history of discovery, properties and taxonomic position of predatory bacteria *Bdellovibrio bacteriovorus*. *B. bacteriovorus* exist in two forms: the first is host-dependent predatory form, the second is saprotrophic host-independent form. *B. bacteriovorus* has a very wide spectrum of bacteriolytic activity, including almost all Gram-negative bacteria. *B. bacteriovorus* is not pathogenic for eukaryotic organisms, as it was demonstrated *in vivo* in animal models. It was shown in some studies that *B. bacteriovorus* may be used as an alternative antibacterial agent against *Salmonella enterica*, *Aeromonas hydrophila*, *Proteus penneri*, *Pseudomonas glycinea*, and *Pseudomonas tolaasii*.

Keywords: *Bdellovibrio bacteriovorus*, predatory bacteria, bacteriolytic activity, alternative antibacterial agent

For citation: Slugin P.V., Ermolenko Z.M., Svetoch E.A., Fursova N.K. *Bdellovibrio bacteriovorus* is the unique biological object with possible perspective for use. Bacteriology. 2018; 3(3): 38–45. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-38-45

В современной биологии «хищничество» определяется как форма трофических взаимоотношений между организмами разных видов, при которых один из них (хищник) атакует другого (жертву) и питается его «плотью», то есть обычно присутствует «акт умерщвления жертвы» [1]. Явление хищничества описано среди животных, растений, протистов, грибов, а также (относительно недавно) у бактерий.

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 обл., Серпуховский район, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967)36-0079
E-mail: slukin@obolensk.org

Статья поступила 23.06.2018 г., принята к печати 29.10.2018 г.

История открытия хищных бактерий и их систематическое положение

Хищные бактерии впервые были обнаружены Stolp & Petzold в 1962 г. при поиске почвенных бактериофагов и описаны ими как активно движущиеся мелкие бактерии. В отличие от бактериофагов, эти бактерии демонстрировали медленно проявляющуюся литическую активность против испытуемых тест-культур вида *Pseudomonas fluorescens* [2].

For correspondence:

Pavel V. Slugin, researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation. Phone: (4967) 36-0079
E-mail: slukin@obolensk.org

The article was received 23.06.2018, accepted for publication 29.10.2018

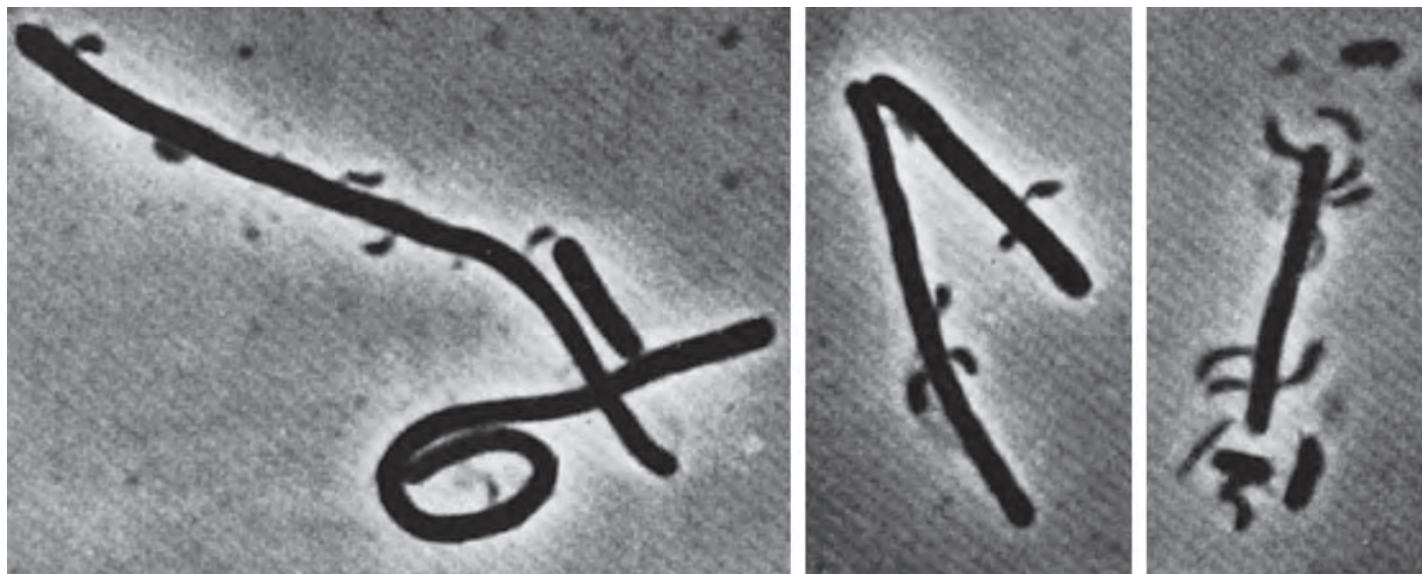


Рис. 1. Взаимодействие клеток штамма *Bdellovibrio bacteriovorus* Bd.A3.12 в смешанной культуре с клетками штамма *Pseudomonas fluorescens* A3.12. Zeiss Photomicroscope; 100× Neofluar Ph 3, фазово-контрастный объектив с масляной иммерсией, на 1,32; фазово-контрастный конденсор V Z на 1,40. Финальная магнификация ×2060 [3].

Бактериям было присвоено родовое название *Bdellovibrio* (βδέλλα – пиявка, греч.). Они проникали внутрь атакуемой клетки-хозяина, размножались в ней и лизировали ее, за что и были названы «хищными и бактериолизическими» (predatory and bacteriolytic) [3]. Позже хищные бактерии были обнаружены в сточных, пресных и морских водах, а также в кишечнике человека и животных [4]. В 1980-х годах были описаны хищные бактерии родов *Micavibrio* и *Vampirovibrio*, которые не проникали внутрь клеток хозяев, а только прикреплялись к их поверхности [5].

По современной систематике бактерий, основанной на анализе первичных последовательностей генов 16S рРНК и генов «домашнего хозяйства», хищные бактерии отнесены к трем классам: *Alphaproteobacteria* (виды *Micavibrio aeruginosavorus* и *Micavibrio admirandus*); *Deltaproteobacteria* (виды *Bdellovibrio bacteriovorus*, *Bacteriovorax starrii* и *Bacteriovorax stolpii*) и *Melainabacteria* (вид *Vampirovibrio chlorellavorus*) [6–10]. Бактерии, сходные с *Bdellovibrio bacteriovorus* по типу питания, объединяют в несистематическую группу – BALO (*Bdellovibrio and like organisms*, *Bdellovibrio* и подобные организмы). Наиболее изученным и охарактеризованным на сегодняшний день видом хищных бактерий является *Bdellovibrio bacteriovorus*, которому и посвящен настоящий обзор литературы.

Культурально-морфологические свойства

Морфология клеток и характер их взаимодействия с клетками штаммов-хозяев были визуализированы с помощью фазово-контрастной и электронной микроскопии (рис. 1, 2). Это мелкие грамтрицательные бактерии длиной до 1 мкм и толщиной ~0,3 мкм. Они имеют один полярный жгутик, благодаря которому активно двигаются со скоростью около 160 мкм/с, являясь «рекордсменами» по скорости передвижения среди бактерий [3, 11]. В верхнем слое питательной среды при культивировании методом двуслойного агара *B. bacteriovorus* на фоне штамма-хозяина формирует негативные бляшки [2].

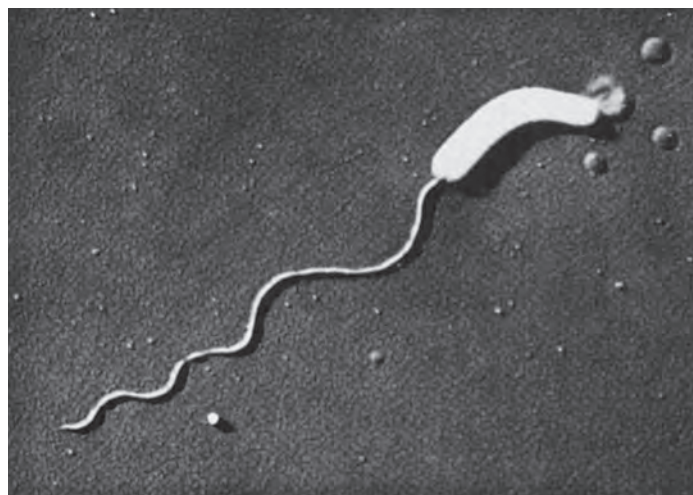


Рис. 2. Микрофотография клетки *Bdellovibrio bacteriovorus* при увеличении ×14 000 [3].

Установлено, что клетки *B. bacteriovorus* проявляют положительный хемотаксис в отношении одних веществ (аминокислоты, соли органических кислот, D-глюкозо-6-фосфат, ацетил коэнзим А) и катионов (аммония, бария, марганца и калия) и отрицательный – в отношении других. Спектры хемотаксиса различаются для разных штаммов *B. bacteriovorus*. Для всех штаммов вида характерен азотаксис – положительный хемотаксис к источнику кислорода [12, 13].

Показано, что клеточная стенка бактерий рода *Bdellovibrio* имеет строение, типичное для грамтрицательных бактерий [14]. Для *B. bacteriovorus* описано специфическое строение ЛПС, липиды которого содержат α-D-маннозу вместо остатков фосфатных групп [15]. Для *B. stolpii* описано наличие во внешней мембране сфингофосфолипидов, редко встречающегося у бактерий [16].

В ранних исследованиях показана высокая чувствительность хищной формы *B. bacteriovorus* к ультрафиолетовому излучению длинноволнового диапазона (ультрафиолет А)

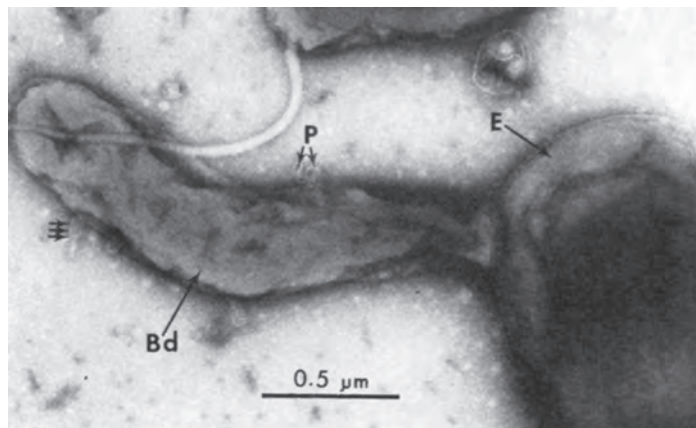


Рис. 3. Электронная микрофотография взаимодействия бактериофага MAC-3 (P) с клеткой штамма *Bdellovibrio bacteriovorus* 114 (Bd), атакующей клетку *Escherichia coli* ATCC 15144 (E) [23].



Рис. 4. Электронная микрофотография взаимодействия клеток штамма *Bdellovibrio bacteriovorus* Bd.100 с клеткой штамма-хозяина *Erwinia amylovora* 100 при увеличении $\times 26\ 200$ [3].

и низкая чувствительность к нему сапротрофной формы, что объясняется наличием специфического пигмента у последней [17].

B. bacteriovorus – облигатный аэроб, однако может в течение нескольких дней сохранять жизнеспособность и размножаться в бескислородных и микроаэрофильных условиях [18, 19]. Проявление хищнической активности *B. bacteriovorus* зафиксировано в диапазоне температур от 19 до 42°C с оптимумом при 28°C [18, 20], при высоком содержании солей Mg^{2+} и Ca^{2+} в окружающей среде и при pH от 5,6 до 8,6. Показана возможность хищнического роста *B. bacteriovorus* на клиническом изоляте *Klebsiella pneumoniae* EARSSU271, устойчивом к карбапенемам, *in vitro* в сыворотке человеческой крови, дополненной плазмой АВ [21].

Для культивирования как сапротрофной, так и хищной форм бактерий рода *Bdellovibrio* используют богатые плотные и жидкие питательные среды на основе среды Nutrient broth с добавлением $MgCl_2$ и $CaCl_2$ до конечных концентраций 2 и 3 мМ соответственно [22].

Для *B. bacteriovorus* описана чувствительность к литическим бактериофагам, выделенным из сточных вод на сапротрофной форме этих бактерий-хищников [23], причем

чувствительность как сапротрофной, так и хищной форм *B. bacteriovorus* (рис. 3).

Для BALO описана штаммоспецифичная чувствительность к антибактериальным препаратам: бета-лактамам, ванкомицину, колистину, аминогликозидам, полимиксинам, налидиксовой кислоте и стрептомицину. У *B. bacteriovorus* «дикого» типа зафиксирована способность к формированию стрептомицин-устойчивых мутантов [3, 24].

Показано, что бактерии *B. bacteriovorus* и BALO сохраняют способность к размножению и хищническому образу жизни после хранения в течение месяца в виде негативных колоний на двухслойном агаре и в жидкой питательной среде при температуре 5°C, а также после длительного хранения в лиофильно высушенном виде совместно с клетками штамма-хозяина [3, 4].

Жизненный цикл

У бактерий *B. bacteriovorus* выявлены две формы существования: хищная – зависимая от хозяина (host dependent, HD) и сапротрофная – независимая от хозяина (host independent, HI). Хищная форма включает в себя фазу атаки (вне бактерии-хозяина) и фазу размножения внутри периплазматического пространства бактерии-хозяина. Для некоторых представителей рода *Bdellovibrio*, кроме того, описано существование покоящихся форм, устойчивых к высушиванию [25]. В течение фазы атаки клетки *B. bacteriovorus* активно двигаются во внешней среде, на большой скорости сталкиваются с клетками грамотрицательных бактерий. *B. bacteriovorus* прикрепляется к наружной мембране клетки-хозяина (рис. 4) и проникает в ее периплазматическое пространство, где теряет жгутик и выделяет большое количество гидролитических ферментов, «переваривающих» внутреннее содержимое бактерии-добычи. В течение фазы размножения *B. bacteriovorus* растет без деления внутри бактерии-хозяина, образуя асепатную нитевидную клетку. Затем происходит септация нити на 2–7 частей, каждая из которых превращается в бактериальную клетку с одним жгутиком. Новые клетки *B. bacteriovorus* лизируют внешнюю мембрану «переваренной» клетки-хозяина и выходят во внешнюю среду. Продолжительность HD-цикла составляет ~100 минут [3, 26].

В популяции клеток *B. bacteriovorus* спонтанно, с частотой 10^{-6} – 10^{-7} , появляются мутанты HI, способные к сапрофитному питанию и образующие после 7-дневной инкубации при температуре 30°C на плотной питательной среде колонии диаметром от едва заметного до ~3 мм. Обратно, в популяции HI-мутантов *B. bacteriovorus* спонтанно, с частотой 10^{-6} , появляются мутанты HD, способные к хищническому образу жизни [3]. HI-мутанты обладают сниженной способностью к росту в периплазматическом пространстве бактерий и образуют негативные бляшки мельче по размеру и менее прозрачные, чем образованные HD-штаммами *B. bacteriovorus* дикого типа [27]. В отличие от HD-формы, HI-мутанты могут представлять собой клетки различной формы и иметь от одного до трех жгутиков различной толщины [3].

Бактериолитическая активность

Спектр бактериолитической активности *B. bacteriovorus* очень широк и потенциально включает практически все гра-

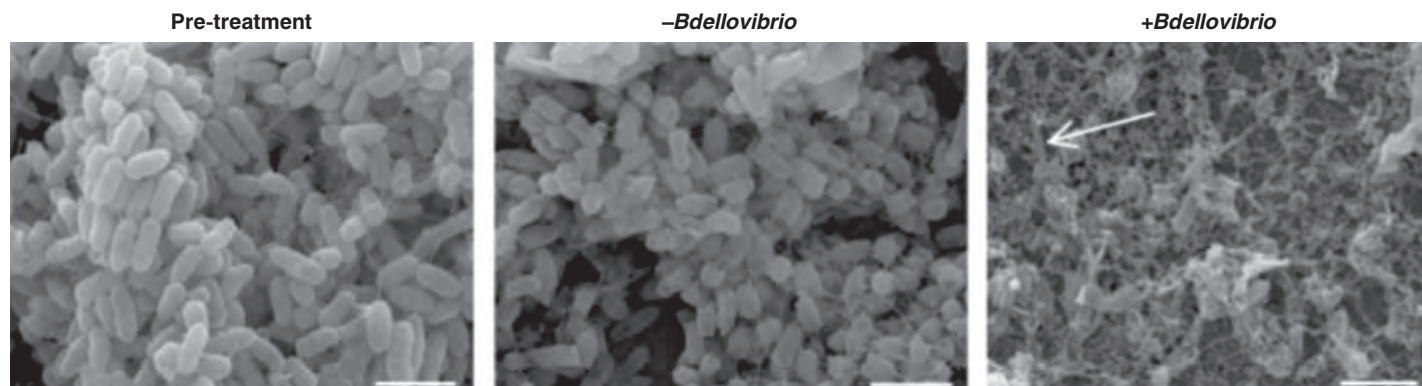


Рис. 5. Электронная микрофотография воздействия хищных бактерий штамма *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J на биопленку штамма *Escherichia coli* ZK2686 на разделе фаз (интерфейсе) воздух-жидкость. Стрелкой указана прикрепленная клетка *Bdellovibrio bacteriovorus*. Размер деления шкалы 2 нм. Магнификация $\times 10\,000$ [38].

мотрицательные бактерии [3], в том числе возбудителей госпитальных и внегоспитальных инфекций: *Acinetobacter spp.*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, *Shigella spp.*, *Vibrio spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Burkholderia cepacia*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Legionella spp.* и др. [28–31]. Особый интерес представляет литическая активность клеток *B. bacteriovorus* против бактериальных возбудителей инфекций ротовой полости и стоматологических заболеваний человека: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens* и *Fusobacterium nucleatum* [32–35]. Показано губительное действие *B. bacteriovorus* на цианобактерии *Microcystis aeruginosa*, загрязнители водоемов, участвующие в «цветении» воды [36]. Спектры бактериолитической активности значительно различаются для разных штаммов *B. bacteriovorus* [30].

Важным свойством клеток *B. bacteriovorus* является их способность проявлять бактериолитическую активность не только против планктонных форм грамотрицательных бактерий, но и против бактериальных биопленок (рис. 5), а также способность поражать гипермукоидные клетки бактерий, покрытые толстым слоем капсульного вещества (рис. 6) [37–39].

Чувствительность к бактериолитическому действию *B. bacteriovorus* у штаммов грамотрицательных бактерий связана с отсутствием у них или повреждением S-слоев клеточной поверхности, которые представляют собой паракристаллические двумерные массивы белков или гликопротеинов, покрывающих клеточную поверхность некоторых штаммов и видов бактерий [40].

Бактериолитическая активность *B. bacteriovorus* зависит от окружающей среды: показано, что ряд веществ (глюкоза, глицерин, аскорбиновая кислота, тиогликолят натрия, цистеин и глутатион) в высоких концентрациях снижают эту активность [3, 41].

Молекулярно-генетические особенности

В 2004 г. геном штамма *B. bacteriovorus* HD100 был секвенирован и аннотирован в базе данных GenBank (NC_005363.1) (таблица). Особенностью генома *B. bacteriovorus* является большое количество генов гидролаз: пептидаз и протеиназ ($n = 150$), ДНКаз ($n = 20$), липаз ($n = 15$), гликаназ ($n = 10$),

РНКаз ($n = 9$) и других гидролитических белков ($n = 89$). Большинство продуктов этих генов участвуют в переваривании бактерии-хозяина [42].

Сопоставление морфофункциональных свойств *B. bacteriovorus* и результатов анализа их генома позволило создать модель хищнической формы существования, состоящей из 8 стадий.

Стадия I (фаза атаки) – движение с большой скоростью с помощью полярного жгутика – обеспечивается наличием 6 кластеров генов подвижности и 6 копий генов флагеллина [43].

Стадия II – обратимый контакт с клеткой добычи, переходящий в необратимое закоривание – пассивное белок-белковое и ЛПС-ЛПС взаимодействие между компонентами внешних мембран; активная адгезия с помощью пилей IV типа (гены *pil*) и белков флагеллина (гены *tadA* и *tadB*).

Стадия III – *B. bacteriovorus* генерирует небольшое отверстие во внешней мембране и пептидогликановом слое клетки-хозяина, проникает в периплазматическое пространство, теряет жгутик и запечатывает отверстие во внешней мембране; этот процесс осуществляется смесью протеолитических ферментов (136 генов протеиназ), которые растворяют пептидогликан и другие компоненты клетки-добычи.

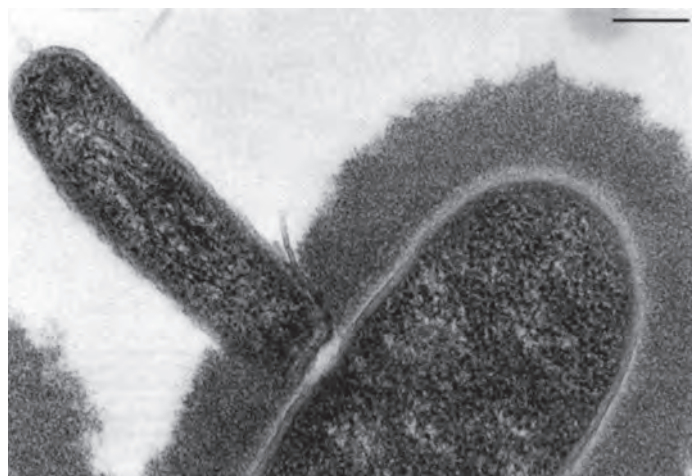


Рис. 6. Микрофотография взаимодействия клетки штамма *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J с капсулированной клеткой штамма *Escherichia coli* K29. Размер деления шкалы 200 нм [39].

Таблица. Основные геномные характеристики штамма *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 [42]

Вид	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>
Штамм	HD100 (Deutsche Sammlung Mikroorganismen DSM50701)
Размер генома, п.н.	3782950
содержание ГЦ	50,7%
содержание ГЦ в кодирующих областях	50,4%
Количество открытых рамок считывания нуклеотидных последовательностей, подобных генам известных белков	1995
консервативных гипотетических белков	382
гипотетических белков	1207
кодирующий потенциал	93%
средняя длина нуклеотидных последовательностей генов, п.н.	982
Количество оперонов рРНК	2
Количество генов тРНК	36
Мобильные генетические элементы	1 IS элемент 4 транспозазы
Четыре области, отличающиеся по ГЦ составу	оперон синтеза ЛПС вставка профага в ген тРНК ^{met} кластер рибосомных генов оперон системы рестрикции-модификации
	150 протеаз/пептидаз 20 ДНКаз
Нуклеотидные последовательности, кодирующие гипотетические ферменты	9 РНКаз 10 гликаназ 15 липаз 89 прочих
Примечание: п.н. – пар нуклеотидов; ГЦ – гуанин, цитозин; рРНК – рибосомная РНК; тРНК – транспортная РНК; тРНК ^{met} – транспортная РНК метионина; IS – insertion sequence.	

Стадия IV – репликация ДНК и синтез клеточных биополимеров *B. bacteriovorus*; интересно, что в геноме бактерии-хищника присутствуют гены, кодирующие синтез 11 аминокислот, и гены «деградации» только 10 аминокислот [37], но при этом присутствует полный набор генов ферментов для образования пуриновых и пиримидиновых оснований; большинство структур бактерии-хозяина гидролизуются до мономеров, однако есть данные об использовании *B. bacteriovorus* отдельных мембранных белков организма хозяина – OmpF [44].

Стадия V – изменение формы клетки-добычи и образование совместной структуры бделлопласта – в геноме *B. bacteriovorus* обнаружено 9 генов, кодирующих гликан-модифицирующие ферменты (растворимые и мембранно-связанные литические трансгликозилазы, эффлектор гидролиза муреина); при этом активируются эффлюксные насосы (147 ABC-семейства и 97 MFS-суперсемейства) [45].

Стадия VI – филаментозная клетка *B. bacteriovorus*, которая в несколько раз превышает исходный размер клетки, начинает септироваться (контролируется генами, гомологичными *mreB*, *mbi*, *ftsZ* и *smc*).

Стадия VII – формирование жгутиковых клеток *B. bacteriovorus* во всем объеме клетки-хозяина.

Стадия VIII – продукция гидролитических ферментов для растворения оставшегося слоя пептидогликана и наружной мембраны клетки-добычи для высвобождения потомства *B. bacteriovorus* [42].

Удивительной особенностью генома *B. bacteriovorus* является наличие в нем не только гена цитохромоксидазы *CYTaа3* (необходимой для аэробного дыхания клетки), но и

генов нитратредуктазы и редуказы оксида азота, что указывает на возможность использования этой бактерией в качестве конечных акцепторов электронов не только кислорода, но и других соединений [46].

Патогенность *B. bacteriovorus* для эукариотических организмов и клеточных культур

Вопрос о патогенности *Bdellovibrio* по отношению к эукариотическим организмам является важным с точки зрения дальнейшего возможного использования этого биологического объекта в ветеринарии и медицине. Отсутствие патогенности *B. bacteriovorus* для эукариотических организмов было продемонстрировано *in vivo* на ряде животных моделей.

В эксперименте *in vivo* на модели двухсуточных цыплят показано отсутствие у экспериментальных животных каких-либо симптомов заболеваний (летаргии, потери веса, сгорбленной осанки, взъерошенных перьев, поникших крыльев, аномальных выделений и др.) в течение 4 нед после перорального введения им суспензии *B. bacteriovorus* в дозе $1,9 \times 10^6$ БОЕ/особь [18].

На «глазной модели» кроликов *in vivo* после нанесения на глазное яблоко кролика 100 мкл суспензии клеток *B. bacteriovorus* в концентрации 10^9 БОЕ/мл было показано отсутствие симптомов кератоконъюнктивита (воспаления роговицы и конъюнктивы, усиленного слезоотделения, гнойных и слизистых выделений, отека конъюнктивы) [47].

Не обнаружено негативного воздействия клеток *B. bacteriovorus* HD100 на организмы личинок восковой моли *Galleria mellonella*, т. к. через 11 сут после инъекции им $1,1 \times 10^7$ БОЕ/особь клеток хищных бактерий жизнеспособность сохранили 100% особей [30].

В экспериментах *in vitro* при сокультивировании бактерий *B. bacteriovorus* с первичными культурами клеток печени мыши, почек хомяка и молочных желез крупного рогатого скота было показано, что в течение 10 ч клетки *B. bacteriovorus* не прикреплялись к эукариотическим клеткам и не проникали внутрь этих клеток. Через 6–18 ч эксперимента численность клеток *B. bacteriovorus* снизилась на 20–40% по сравнению с исходным уровнем [48].

При совместной инкубации клеток *B. bacteriovorus* с кроличьими и бычьими эритроцитами через 30 мин отмечали прикрепление 10–30 клеток бактерий-хищников к 3% эритроцитов и проникновение 1–3 клеток *B. bacteriovorus* внутрь некоторых эритроцитов. При этом размножения *B. bacteriovorus* в данных условиях не наблюдали [48].

При сокультивировании клеток *B. bacteriovorus* с неоплодотворенными яйцеклетками кролика в течение 2–12 ч показали обратимое присоединение бактерий-хищников к внешней части большинства яйцеклеток, но без проникновения внутрь клеток. При введении бактерий *B. bacteriovorus* в перивителлиновое пространство (*zona pellucida*) или цитоплазму неоплодотворенных яйцеклеток кролика внутриклеточного размножения *B. bacteriovorus* не отмечено [48].

Дополнительное доказательство отсутствия негативного воздействия *B. bacteriovorus* на эукариотические клетки получено при совместном культивировании клеток хищных бактерий с культурой клеток лимбального эпителия рогови-

цы человека: через 24 ч сокультивирования не зафиксировано увеличения продукции цитокинов (интерлейкина IL-8 и фактора некроза опухоли TNF- α) эукариотическими клетками [30].

Использование *B. bacteriovorus* в ветеринарии и сельском хозяйстве

В ряде исследований описано использование культур бактерий *B. bacteriovorus* в качестве антибактериального средства на экспериментальных моделях сельскохозяйственных животных, растений и грибной культуры.

Показано, что пероральное введение суспензии клеток *B. bacteriovorus* в желудочно-кишечный тракт двухсуточных цыплят приводило к частичному изменению бактериального микробиома (снижению численности анаэробов и лактобацилл, увеличению численности стрептококков, без изменения численности бифидобактерий и колибактерий), однако это не отражалось на состоянии здоровья птиц [18].

На модели сальмонеллезной инфекции у односуточных цыплят, вызванной пероральным введением $3,16 \times 10^7$ КОЕ на особь клеток высоковирулентного для цыплят штамма *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* P125109, был продемонстрирован лечебный эффект от введения цыплятам (на 10-е сутки после их заражения сальмонеллами) клеток штамма *B. bacteriovorus* HD100 в дозе $9,8 \times 10^6$ БОЕ на цыпленка: концентрация патогена в содержимом кишечника на 2-е сутки после введения препарата хищных бактерий снижалась на порядок [18].

Антибактериальное лечебное действие штамма *B. bacteriovorus* C-1 показано на модели прудовых рыб *Carassius gibelio* (Серебряный карась). Рыб с искусственными повреждениями субдермиса помещали в емкости с водой при температуре 25°C, содержащей культуру патогенной для рыб бактерии *Aeromonas hydrophila* в концентрации $5,0 \times 10^8$ КОЕ/мл. Внесение в воду хищных бактерий *B. bacteriovorus* в концентрации $5,0 \times 10^3$ и $5,0 \times 10^5$ БОЕ/мл снижало гибель рыб *C. gibelio* и составляло 35 и 5% соответственно, в то время как гибель рыб в воде, контаминированной *A. hydrophila* без хищных бактерий, достигала 80% [49].

Аналогичные результаты по антибактериальной защите с помощью хищных бактерий получены на модели королевских креветок *Penaeus vannamei*, инфицированных патогенными бактериями *Proteus penneri* в воде, содержащей $5,0 \times 10^6$ КОЕ/мл патогена. Обработку зараженных креветок хищными бактериями проводили, внося в воду клетки в разных концентрациях. На 7-й день после начала эксперимента были зафиксированы разные уровни смертности креветок в воде, содержащей *P. penneri* (100%) и *P. penneri* с *B. bacteriovorus* в концентрациях $5,0 \times 10^3$ и $1,0 \times 10^4$ БОЕ/мл (42,0 и 21,4 % соответственно) [50].

В другом исследовании продемонстрировано антибактериальное действие *B. bacteriovorus* против возбудителя бактериоза сои *Pseudomonas glycinea*. Сформированные 28-дневные растения сои сорта «Кларк 63» культивировали в стерильных условиях и обрабатывали путем протирания листьев марлевым тампоном, смоченным суспензиями, содержащими бактерии *P. glycinea* и *B. bacteriovorus* в соотношении 1:0 (контроль), 1:1, 1:9 и 1:99. На 10–14-й день после обработки оценивали площадь поражения листьев

бактериальным ожогом и системные симптомы болезни у растений. Показано, что площадь поражения листьев в контроле (*P. glycinea*) составила 100%, в то время как для бактериальных смесей (*P. glycinea* и *B. bacteriovorus*) в соотношении 1:1, 1:9 и 1:99 – 76–100, 1–25 и 1–25% соответственно. Системные патологические симптомы наблюдались у 100% растений в контроле и у 25, 5 и 5% растений в экспериментальных группах [51].

На модели грибной культуры шампиньона двуспорового *Agaricus bisporus* исследовано применение *B. bacteriovorus* против бактериальной пятнистости, вызываемой *Pseudomonas tolaasii*. Стерильную суточную грибницу *A. bisporus* инфицировали нанесением бактериальной суспензии *P. tolaasii* ($1,7 \times 10^6$ КОЕ), через 48 ч оценивали степень поражения грибницы по площади пятна бактериального повреждения. Антибактериальный эффект *B. bacteriovorus* против *P. tolaasii* определяли, нанося на грибницу смесь культур *P. tolaasii* ($1,7 \times 10^6$ КОЕ) и *B. bacteriovorus* ($2,9 \times 10^6$ БОЕ). Внесение хищных бактерий снижало в два раза (по площади) степень поражения грибницы бактериальной пятнистостью *P. tolaasii* [52].

Использование *B. bacteriovorus* в качестве биологического дезинфектанта

Показана эффективность использования суспензии хищных бактерий штамма *B. bacteriovorus* 45k ($5,0 \times 10^9$ БОЕ) в качестве биологического дезинфектанта в модельном эксперименте при обработке поверхностей (площадью $\approx 6,5$ см²) из нержавеющей стали, контаминированных бактериальными возбудителями ($1,0 \times 10^9$ КОЕ) пищевой инфекции: шига-токсин продуцирующими штаммами *E. coli* O157:H7 и *E. coli* O26:H11. Антибактериальную эффективность *B. bacteriovorus* оценивали через 24 ч, делая смыв с поверхности и высевая бактериальную суспензию на плотные питательные среды. Для поверхностей, обработанных хищными бактериями *B. bacteriovorus*, зафиксировано снижение показателя КОЕ шига-токсинпродуцирующих штаммов *E. coli* на три порядка по сравнению с аналогичным показателем для контрольных поверхностей (не обработанных *B. bacteriovorus*) [20].

Заключение

Хищные бактерии являются уникальным и малоизученным объектом в биологии. Исследования биологических и генетических особенностей данной группы бактерий представляют интерес как с точки зрения фундаментальных вопросов микробиологии, так и с точки зрения возможного их использования в качестве антибактериальных агентов в практике ветеринарии, медицине и пищевой промышленности.

Литература/References

1. Гиляров МС. Биологический энциклопедический словарь. М.: Советская энциклопедия, 1986, 893 с. / Gilyarov MS. Biologicheskii entsiklopedicheskii slovar'. Moscow: "Sovetskaya entsiklopediya" Publ., 1986, 893 p. (In Russian).
2. Stolp H, Petzold H. Untersuchungen fiber einen obligat parasitischen Mikroorganismus mit lytischer Aktivitat for *Pseudomonas*-Bakterien. Phytopathol Z. 1962;45:364-390.

3. Stolp H, Starr MP. *Bdellovibrio bacteriovorus* gen. et sp. n., a predatory, ectoparasitic, and bacteriolytic microorganism. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1963;29:217-248.
4. Jurkevitch E. Predatory behaviors in bacteria-diversity and transitions. *Microbe-Amer Soc Microbiol*. 2007;2:67-73.
5. Guerrero R, Pedros-Alio C, Esteve I, Mas J, Chase D, Margulis L. Predatory prokaryotes: predation and primary consumption evolved in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83(7):2138-2142.
6. Davidov Y, Huchon D, Koval SF, Jurkevitch E. A new alpha-proteobacterial clade of *Bdellovibrio*-like predators: implications for the mitochondrial endosymbiotic theory. *Environ Microbiol*. 2006;8(12):2179-2188. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2006.01101.x
7. Schwudke D, Strauch E, Krueger M, Appel B. Taxonomic studies of predatory bdellovibrios based on 16S rRNA analysis, ribotyping and the hit locus and characterization of isolates from the gut of animals. *Syst Appl Microbiol*. 2001; 24(3):385-394.
8. Snyder AR, Williams HN, Baer ML, Walker KE, Stine OC. 16S rDNA sequence analysis of environmental *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALO) reveals extensive diversity. *Int J Sys. Evol Microbiol*. 2002;52(6):2089-2094. DOI: 10.1099/00207713-52-6-2089
9. Soo RM, Woodcroft BJ, Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P. Back from the dead; the curious tale of the predatory cyanobacterium *Vampirovibrio chlorellavorus*. *Peer J*. 2015;3:e968.
10. Wang Z, Kadouri DE, Wu M. Genomic insights into an obligate epibiotic bacterial predator: *Micavibrio aeruginosavorus* ARL-13. *BMC Genomics*. 2011 Sep 21;12: 453. DOI: 10.1186/1471-2164-12-453.
11. Rittenberg SC. *Bdellovibrio*: attack, penetration, and growth on its prey. *ASM News* 1983;49:435-439.
12. Straley SC, Conti SF. Chemotaxis in *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Bacteriol*. 1974;120(1):549-551.
13. Straley SC, LaMarre AG, Lawrence LJ, Conti SF. Chemotaxis of *Bdellovibrio bacteriovorus* toward pure compounds. *J Bacteriol*. 1979;140(2):634-642.
14. Thomashow MF, Rittenberg SC. Penicillin-induced formation of osmotically stable spheroplasts in nongrowing *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J. Bacteriol*. 1978; 133(3):1484-1491.
15. Schwudke D, Linscheid M, Strauch E, Appel B, Zahringer U, Moll H, et al. The obligate predatory *Bdellovibrio bacteriovorus* possesses a neutral lipid A containing alpha-D-Mannoses that replace phosphate residues: similarities and differences between the lipid As and the lipopolysaccharides of the wild type strain *B. bacteriovorus* HD100 and its host-independent derivative HI100. *J Biol Chem*. 2003;278(30):27502-27512.
16. Watanabe Y, Nakajima M, Hoshino T, Jayasimhulu K, Brooks EE, Kaneshiro ES. A novel sphingophosphonolipid head group 1-hydroxy-2-aminoethyl phosphonate in *Bdellovibrio stolpii*. *Lipids*. 2001;36(5):513-519.
17. Friedberg D. Effect of light on *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Bacteriol*. 1977;131(2):399-404.
18. Atterbury RJ, Hopley L, Till R, Lambert C, Capeness MJ, Lerner TR, et al. Effects of Orally Administered *Bdellovibrio bacteriovorus* on the Well-Being and *Salmonella* Colonization of Young Chicks. *Appl Environ Microb*. 2011;77(16):5794-5803.
19. Schoeffield AJ, Williams HN, Turng BF, Falkler WA. A comparison of the survival of intraperiplasmic and attack phase *Bdellovibrios* with reduced oxygen. *Microbial Ecol*. 1996;32(1):35-46.
20. Fratamico PM, Cooke PH. Isolation of *Bdellovibrios* that prey on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* species and application for removal of prey from stainless steel surfaces *J Food Saf*. 1996;16:161-173.
21. Baker M, Negus D, Raghunathan D, Radford P, Moore C, Clark G, et al. Measuring and modelling the response of *Klebsiella pneumoniae* KPC prey to *Bdellovibrio bacteriovorus* predation, in human serum and defined buffer. *Sci Rep*. 2017 Aug 21;7(1):8329. DOI: 10.1038/s41598-017-08060-4.
22. Fratamico PM, Whiting RC. Ability of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109j to lyse gram-negative food-borne pathogenic and spoilage bacteria. *J Food Protect*. 1995; 58:160-164.
23. Althausen M, Samsonoff WA, Anderson C, Conti SF. Isolation and preliminary characterization of bacteriophages for *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Virol*. 1972;10(3):516-23.
24. Guether DL, Williams HN. AntibioGram characterization of aquatic and terrestrial *Bdellovibrio* isolates. Abstract Q-244 presented at the 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology, Atlanta, Georgia, USA, 1993.
25. Burger A, Drews G, Ladwig R. Host range and infection cycle of a newly isolated strain of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Arch Mikrobiol*. 1968;61(3): 261-279.
26. Sockett RE. Predatory lifestyle of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Annu Rev Microbiol*. 2009;63:523-39. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073346
27. Cotter TW, Thomashow MF. A conjugation procedure for *Bdellovibrio bacteriovorus* and its use to identify DNA sequences that enhance the plaque-forming ability of a spontaneous host-independent mutant. *J Bacteriol*. 1992;174(19): 6011-6017.
28. Dashiff A, Junka RA, Libera M, Kadouri DE. Predation of human pathogens by the predatory bacteria *Micavibrio aeruginosavorus* and *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Appl Microbiol*. 2011 Feb;110(2):431-44. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04900.x
29. Markelova Nlu. Interaction of *Bdellovibrio bacteriovorus* with *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. *Mikrobiologija*. 2010;79:779-781.
30. Shanks RM, Davra VR, Romanowski EG, Brothers KM, Stella NA, Godbole D, et al. An eye to a kill: using predatory bacteria to control gram-negative pathogens associated with ocular infections. *PLoS One*. 2013 Jun 18;8(6):e66723. DOI: 10.1371/journal.pone.0066723.
31. Tomov A, Kassovsky V, Chorbadjiiska L, Tsvetkova E, Tsanev N, Vencheva Z. Lytic activity of *Bdellovibrio bacteriovorus* against bacteria of the family Legionellaceae. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg*. 1982;252(1):96-100.
32. Dashiff A, Kadouri DE. Predation of oral pathogens by *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *Mol Oral Microbiol*. 2011 Feb;26(1):19-34. DOI: 10.1111/j.2041-1014.2010.00592.x.
33. Harini K, Ajila V, Hegde S. *Bdellovibrio bacteriovorus*: A future antimicrobial agent? *J Indian Soc Periodontol*. 2013;17(6):823-825.
34. Loozen G, Boon N, Pauwels M, Slomka V, Rodrigues HE, Quirynen M, et al. Effect of *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 on multispecies oral communities. *Anaerobe*. 2015 Oct;35(Pt A):45-53. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2014.09.011.
35. Van Essche M, Quirynen M, Sliepen I, Van Eldere J, Teughels W. *Bdellovibrio bacteriovorus* attacks *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Dent Res*. 2009 Feb;88(2):182-6. DOI: 10.1177/0022034508329693.
36. Caiola GM, Pellegrini S. Lysis of *Microcystis aeruginosa* by *Bdellovibrio* like bacteria. *J Phycol*. 1984;20:471-475.
37. Dwidar M, Monnappa AK, Mitchell RJ. The dual probiotic and antibiotic nature of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *BMB Rep*. 2012 Feb;45(2):71-8. DOI: 10.5483/BMBRep.2012.45.2.71.
38. Kadouri D, O'Toole GA. Susceptibility of biofilms to *Bdellovibrio bacteriovorus* attack. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Jul;71(7):4044-51. DOI: 10.1128/AEM.71.7.4044-4051.2005
39. Koval SF, Bayer ME. Bacterial capsules: no barrier against *Bdellovibrio*. *Microbiology*. 1997;143(3):749-753.
40. Gerbino E, Carasi P, Mobili P, Serradell MA, Gomez-Zavaglia A. Role of S-layer proteins in bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*. 2015 Dec;31(12):1877-87. DOI: 10.1007/s11274-015-1952-9
41. Dashiff A, Keeling TG, Kadouri DE. Inhibition of Predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* and *Micavibrio aeruginosavorus* via Host Cell Metabolic Activity in the Presence of Carbohydrates. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Apr;77(7):2224-31. doi: 10.1128/AEM.02565-10

42. Rendulic S, Jagtap P, Rosinus A, Eppinger M, Baar C, et al. A predator unmasked: life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective. *Science*. 2004;303(5658):689-692. DOI: 10.1126/science.1093027
43. Lambert C, Evans KJ, Till R, Hogley L, Capeness M, Rendulic S, et al. Characterizing the flagellar filament and the role of motility in bacterial prey-penetration by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Mol Microbiol*. 2006;60(2):274-286. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05081.x
44. Diedrich DL, Duran CP, Conti SF. Acquisition of *Escherichia coli* outer membrane proteins by *Bdellovibrio* 109D. *J Bacteriol*. 1984;159(1):329-334.
45. Barabote RD, Rendulic S, Schuster SC, Saier MHJr. Comprehensive analysis of transport proteins encoded within the genome of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Genomics*. 2007 Oct;90(4):424-46. DOI: 10.1016/j.ygeno.2007.06.002
46. Sockett RE, Lambert C. *Bdellovibrio* as therapeutic agents: a predatory renaissance? *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(8):669-675. DOI: 10.1038/nrmicro959
47. Nakamura M. Alteration of *Shigella pathogenicity* by other bacteria. *Am J Clin Nutr*. 1972;25(12):1441-1451.
48. Lenz RW, Hespell RB. Attempts to grow *Bdellovibrios* micurgically-injected into animal-cells. *Arch Microbiol*. 1978;119:245-248.
49. Chu WH, Zhu W. Isolation of *Bdellovibrio* as biological therapeutic agents used for the treatment of *Aeromonas hydrophila* infection in fish. *Zoonoses Public Hlth*. 2010;57:258-264.
50. Cao H, He S, Lu L, Yang X, Chen B. Identification of a *Proteus penneri* isolate as the causal agent of red body disease of the cultured white shrimp *Penaeus vannamei* and its control with *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2014 Feb;105(2):423-30. DOI: 10.1007/s10482-013-0079-y.
51. Scherff RH. Control of bacterial blight of soybean by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Phytopathology*. 1973;63:400-402.
52. Saxon EB, Jackson RW, Bhumbra S, Smith T, Sockett RE. *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 guards against *Pseudomonas tolaasii* brown-blotch lesions on the surface of post-harvest *Agaricus bisporus* supermarket mushrooms. *BMC Microbiol*. 2014 Jun 20;14:163. DOI: 10.1186/1471-2180-14-163

Информация об авторах:

Ермоленко Зинаида Михайловна, 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

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, 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

Information about authors:

Zinaida M. Ermolenko, junior researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0079

Edward A. Svetoch, Dr. Sci. (Vet.), professor, Chief Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0079

Nadezhda K. Fursova, Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0079

НОВОСТИ НАУКИ

Бактерии дезактивируют раковые лекарства

По данным ученых из Израиля, бактерии могут проникать внутрь опухолей и даже внутрь самих раковых клеток, а затем использовать свои собственные метаболические механизмы для разрушения противораковых лекарств и защиты опухоли. В частности, источником ингибирующего химиотерапию эффекта были бактерии *Mycoplasma hyorhinitis*, живущие в клетках кожи и на ней. По данным исследователей, эти и многие другие распространенные бактерии снабжены метаболическими путями, которые могут разрушить молекулу лекарственного противоракового средства гемцитабина и предотвращать его работу. Эти бактерии обладают геном, кодирующим фермент CDD-цитидиндезаминазу. Он переваривает гемцитабин, делая его безвредным для опухоли. Эти опыты были проведены на мышах. Существует ли подобное явление в организме человека, неизвестно, однако у 113 больных в раковых опухолях были обнаружены бактерии, способные разрушать гемцитабин. По мнению ученых, использование антибиотиков широкого спектра действия может принести больше вреда, чем пользы при определенных обстоятельствах. Лучшим подходом может стать разработка лекарств для избирательного блокирования бактериального метаболизма противораковых лекарств.



Bacteria deactivate cancer drugs

Science News. Naked Scientists [WWW Document], n.d. URL <https://www.thenakedscientists.com/articles/science-news/bacteria-deactivate-cancer-drugs> (accessed 10.3.18).

Микробиологическая порча пищевых продуктов и перспективные направления борьбы с этим явлением

З.М.Ермоленко, Н.К.Фурсова

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

Одной из важных экономических и производственных проблем, с которыми сталкивается человечество в современном мире, является проблема сохранности качества продуктов питания, которые могут быть подвержены воздействию разнообразных микроорганизмов – бактерий, дрожжей и плесневых грибов. Ежегодно миллионы людей во всем мире заболевают инфекциями, вызванными потреблением некачественных продуктов питания. Особую опасность при этом представляют патогенные микроорганизмы, попадание которых в организм человека может вызвать серьезные заболевания. По данным ВОЗ, от пищевых инфекций в год погибают 2,2 млн человек. Мировые экономические потери из-за этого фактора составляют более 30% от общих потерь. В данном обзоре представлены сведения об особенностях микробиологической порчи различных пищевых продуктов и перспективных подходах борьбы с этим явлением.
Ключевые слова: пищевые продукты, микробиологическая порча, бактериоцины, бактериофаги, эфирные масла

Для цитирования: Ермоленко З.М., Фурсова Н.К. Микробиологическая порча пищевых продуктов и перспективные направления борьбы с этим явлением. Бактериология. 2018; 3(3): 46–57. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-46-57

Microbiological spoilage of food and promising approaches to combat the phenomenon

Z.M.Ermolenko, N.K.Fursova

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

A most important economic and production problem the mankind faces in the modern world is to maintain food quality which may be affected by a variety of microorganisms including bacteria, yeast and fungi. Every year millions of people all over the world develop infections induced by consumption of substandard food products. Pathogenic microorganisms whose entering the human body may induce severe diseases are particularly dangerous. According to the WHO foodborne infections annually kill 2.2 million people, and global economic losses make up over 30% of the total losses. This review presents specific features of microbiological spoilage of various food products as well as suggests promising approaches to combat the challenge.
Keywords: food products, microbiological spoilage, bacteriocins, bacteriophages, essential oils

For citation: Ermolenko Z.M., Fursova N.K. Microbiological spoilage of food and promising approaches to combat the phenomenon. Bacteriology. 2018; 3(3): 46–57. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-46-57

Проблема сохранности качества продуктов питания – одна из важных экономических и производственных проблем, с которыми сталкивается человечество в современном мире. Пищевые продукты являются богатой средой для развития микроорганизмов, при размножении которых в этой среде может произойти накопление вредных для человеческого организма веществ – метаболитов микробных клеток. Это явление называют микробиологической порчей пищевых продуктов, которая в большинстве случаев

является необратимым процессом, приводящим к невозможности использования по назначению испорченных продуктов питания. Микробиологическая порча пищевых продуктов в мире является значимой экономической проблемой и проблемой здравоохранения. По данным ВОЗ, в мире в 2010 г. зарегистрировано 582 млн случаев пищевых инфекций, среди которых 38% – у детей в возрасте до 5 лет; смертность составила 1,09 млн человек, в том числе 34% – детей в возрасте до 5 лет [1].

Для корреспонденции:

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

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0079
E-mail: fursova@obolensk.org

Статья поступила 27.06.2018 г., принята к печати 29.10.2018 г.

For correspondence:

Nadezhda K. Fursova, leading researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: 142279, Moscow region, Serpukhov district, Obolensk, SRCAMB
Phone: (4967) 36-0079
E-mail: fursova@obolensk.org

The article was received 27.06.2018, accepted for publication 29.10.2018

В условиях современной высококонкурентной мировой экономики одной из основных задач, стоящих перед пищевой промышленностью, является обеспечение безопасности пищевых продуктов. Страны-импортеры и экспортеры продовольствия объединяют свои усилия с целью снижения микробиологических рисков. В августе 2012 г. Российская Федерация вступила во Всемирную торговую организацию (ВТО), в соответствии с требованиями которой в настоящее время в нашей стране в пищевой промышленности применяется система качества ХАССП (*Hazard Analysis and Critical Control Point, HACCP*) [2–5]. Постановлением Правительства РФ №1364-р от 29.06.2016 г. утверждена «Стратегия повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 г.», которая ориентирована на обеспечение полноценного питания, профилактику заболеваний, увеличение продолжительности и повышения качества жизни населения, стимулирование развития производства и обращения на рынке пищевой продукции надлежащего качества [6].

Общий экономический ущерб из-за порчи пищевых продуктов точно неизвестен. По некоторым оценкам, из-за деятельности микроорганизмов теряется четверть всей мировой пищевой продукции, в том числе 10% произведенных зерновых и бобовых культур и около 50% овощей и фруктов [7].

Спектр микроорганизмов, которые могут быть причиной порчи продуктов питания, очень широк. Дрожжевые и плесневые грибы, несмотря на то, что их рост происходит медленнее, чем рост бактерий, также могут быть причиной микробиологической порчи продуктов питания, благодаря их способности утилизировать самые разные субстраты и выживать в гораздо более жестких условиях, чем вегетативные формы бактерий [8].

К продуктам, наиболее часто связанным с возникновением вспышек пищевых отравлений, относятся говядина и домашняя птица, яйца и яичные продукты, смешанные продукты, рыба и рыбная продукция [9]. Кроме того, в последнее десятилетие популяризация здорового образа жизни привела к увеличению потребления сырых фруктов и овощей в развитых странах и, одновременно с этим, числа вспышек пищевых инфекций, связанных с потреблением этих продуктов [10].

Особенности микробиологической порчи основных типов пищевых продуктов

Мясо и мясопродукты

Мясные продукты чрезвычайно уязвимы для микробиологической порчи, так как они богаты питательными веществами, их поверхности подвержены быстрой колонизации и размножению бактерий. Эндогенный путь микробного обсеменения мяса связан с общим состоянием животного, поступившего на бойню. Мясо здорового животного может быть обсеменено бактериями – постоянными обитателями его желудочно-кишечного тракта; в случае болезни или травмы животного может иметь место инфицирование тела животного патогенными микроорганизмами (например, сальмонеллами, золотистым стафилококком, возбудителями туберкулеза, бруцеллеза и др.). Экзогенный путь микробного обсеменения мяса связан с этапами разделки туши, транспортировкой, условиями хранения, технологией получения мясопродуктов и санитарным состоянием предприя-

тия. Например, при проверке предприятий в г. Санкт-Петербурге и Ленинградской области из продуктов птицеводства были выделены возбудители колибактериоза, стрептококкоза, стафилококкоза, сальмонеллеза, пастереллеза и аспергиллеза [11–13].

Обсеменение мясных продуктов микроорганизмами может происходить на разных технологических стадиях обработки и хранения. В температурном диапазоне от –1 до +25°C и аэробных условиях быстрее всего поверхность мясосопродуктов колонизируется грамотрицательными бактериями рода *Pseudomonas*, включая виды *P. fluorescens*, *P. lundensis*, *P. putida* и *P. fragi*. В условиях аэробного холодного хранения порча мясных продуктов может быть вызвана бактериями родов *Moraxella*, *Psychrobacter* и *Acinetobacter*. В анаэробных условиях хранения (в вакуумной упаковке) мясо может подвергнуться порче при размножении грамположительных бактерий, таких как микрококки и молочнокислые бактерии [14]. В таблице 1 представлены роды бактерий, чаще всего обнаруживаемые в мясных продуктах и вызывающие их порчу.

Порча мясных продуктов может проявляться в виде ослизнения, гниения, кислого брожения, пигментации и плес-

Таблица 1. Представленность грамположительных и грамотрицательных бактерий в мясных продуктах [14]

Род	Мясо крупного рогатого скота	Мясо птицы
Грамотрицательные бактерии		
<i>Acinetobacter</i>	xx	xx
<i>Aeromonas</i>	xx	x
<i>Alcaligenes</i>	x	x
<i>Campylobacter</i>	–	xx
<i>Citrobacter</i>	x	x
<i>Enterobacter</i>	x	x
<i>Escherichia</i>	x	x
<i>Flavobacterium</i>	x	x
<i>Hafnia</i>	x	–
<i>Moraxella</i>	xx	x
<i>Pantoea</i>	x	x
<i>Proteus</i>	x	x
<i>Pseudomonas</i>	xx	xx
<i>Psychrobacter</i>	xx	x
<i>Salmonella</i>	x	x
<i>Serratia</i>	x	x
<i>Shewanella</i>	x	–
<i>Yersinia</i>	x	–
Грамположительные бактерии		
<i>Bacillus</i>	x	x
<i>Brochothrix</i>	x	x
<i>Carnobacterium</i>	x	–
<i>Clostridium</i>	x	x
<i>Corynebacterium</i>	x	xx
<i>Enterococcus</i>	xx	x
<i>Kocuria</i>	x	x
<i>Kurthia</i>	x	–
<i>Lactococcus</i>	x	–
<i>Lactobacillus</i>	x	–
<i>Leuconostoc</i>	x	–
<i>Listeria</i>	x	xx
<i>Microbacterium</i>	x	x
<i>Micrococcus</i>	x	x
<i>Paenibacillus</i>	x	x
<i>Pediococcus</i>	x	–
<i>Staphylococcus</i>	x	x
<i>Vagococcus</i>	–	xx
<i>Weissella</i>	x	–

«xx» – выявляются чаще всего; «x» – могут встречаться; «–» – не встречаются.

невения. Ослизнение может быть вызвано в основном бактериями рода *Pseudomonas*, обладающими высокой ферментативной активностью, способными утилизировать глюкозу при разных, в том числе низких, температурах [11, 14]. Гниение мяса – следующий этап порчи мяса после его ослизнения – может быть вызвано как аэробными микроорганизмами, так и факультативно или облигатно анаэробными. При температурах, близких к 0°C, возбудителями гниения в основном являются психрофильные бактерии рода *Pseudomonas*; при более высоких температурах хранения мезофильные гнилостные бактерии: протеи, спорообразующие бациллы, клостридии [11, 12]. Кислое брожение развивается обычно в субпродуктах, богатых гликогеном (печень, сердце), оно обусловлено психротропными грамположительными бактериями и дрожжами. Пигментация появляется при накоплении в мясных продуктах пигментообразующих аэробных бактерий, таких как *Pseudomonas prodigiosum* (красный пигмент), *Pseudomonas aeruginosa* (синий пигмент), *Pseudomonas fluorescens* (зеленый пигмент). Плесени при относительно низкой температуре хранения мяса (от –5 до –10°C) вызывают в мясных продуктах распад белков и жиров, повышение щелочности среды; при этом создаются благоприятные условия для последующего размножения гнилостных бактерий [11].

Для увеличения срока годности мясных продуктов применяют вакуумную упаковку, которая более эффективна при использовании газовых смесей разных составов. Однако некоторые микроорганизмы способны выживать и в этих условиях и вызывать порчу продуктов. Описаны случаи выделения из упакованных продуктов бактерий родов *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Yersinia* и *Pasterella*, а также дрожжеподобных грибов родов *Debaryomyces*, *Yarrowia*, *Rhodotorula* и *Candida* [7, 13, 15–18]. Большую опасность представляют грамположительные бактерии, обнаруживаемые в испорченных мясных продуктах, которые вызывают тяжелые токсикоинфекции с множеством летальных исходов: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus gallinarum*, *Clostridium perfringens*, а также не имеющие клеточной стенки бактерии рода *Mycoplasma* [19, 20].

Яйца и яйцепродукты

Содержимое свежих яиц, полученных от здоровых птиц, в идеале является стерильным, что обеспечивается присутствием в яичном белке многих функционально важных мажорных белков: овальбумина (54%), овотрансферрина (12%), овомукоида (11%), овоглобулинов (G2 и G3, 8%), овомуцина (3,5%) и лизоцима (3,5%), а также минорных белков: овоингибитора, овомакроглобулина, овогликопротеина, овофлавопротеина, тиаминсвязывающих белков и авидина. Показано, что эти белки обеспечивают антиоксидантные, антимикробные, антагонистические, антивирусные, противоопухолевые и другие свойства яичного белка [21].

Яйца птицы могут быть обсеменены микроорганизмами либо эндогенным путем, либо экзогенным. Эндогенное заражение яиц происходит при их формировании в яичнике и яйцевоме большой птицы при сальмонеллезе, орнитозе, туберкулезе и других заболеваниях, а также при скрытой форме инфекционного заболевания или при бактерионосительстве. Доля инфицированных яиц, получаемых от птиц-бактерионосителей, составляет от 10 до 95%. Исследование

кишечной микрофлоры куриных эмбрионов показало, что, наряду с бактериями нормофлоры (представителями семейств *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Bifidobacteriaceae* и *Lachnospiraceae*), в ней могут присутствовать и патогенные бактерии (родов *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Klebsiella* и *Rickettsi*) [22, 23]. Наиболее опасными для человека возбудителями инфекций, связанных с употреблением зараженных яиц промышленной птицы или контаминированных высушенных яйцепродуктов, являются сальмонеллы, кокки, протеи, псевдомонады, микобактерии туберкулеза и др. [7, 24].

Сальмонеллез является наиболее актуальной пищевой инфекцией, сильно влияющей на здоровье человека. По оценкам, ежегодно в мире регистрируется 93,8 млн случаев не тифоидного сальмонеллеза, 155 тыс. из которых заканчиваются смертью [25]. В Европе в последние годы сальмонеллез был второй по значимости зоонозной инфекцией (20,4 случаев на 100 тыс. населения в 2013 г.) и наиболее частой причиной вспышек пищевой инфекции, несмотря на тенденцию к снижению заболеваемости в результате деятельности по программам контроля этого возбудителя [26].

Экзогенное обсеменение яиц микроорганизмами происходит при их сборе, хранении и транспортировке – в результате проникновения микроорганизмов, в том числе патогенных, через поры скорлупы и подскорлупные оболочки. Проникшие внутрь яйца гнилостные бактерии, плесневые грибы или актиномицеты размножаются на богатой питательной среде, метаболизируют его содержимое; яичный белок при этом разжижается, становится мутным, появляется неприятный запах сероводорода [27, 28]. Для продления активности собственных защитных свойств яиц промышленной птицы и для предотвращения их эндогенной контаминации микроорганизмами яйца хранят при температуре 0–2°C и относительной влажности воздуха 85%, а также используют дезинфицирующую обработку парами формальдегида, йода и хлора.

Молочные продукты

В молоке могут содержаться микроорганизмы (бактерии, вирусы, грибы и простейшие), как условно полезные для человека, так и патогенные, способные вызвать порчу данного вида продукта. За период времени с 1917 г. по настоящее время, благодаря совершенствованию методов детекции и идентификации, значительно расширились знания о видовом разнообразии микроорганизмов, присутствующих в молоке и молочных продуктах. В последнее десятилетие разработан новый аналитический подход на основе технологии MALDI-TOF-MS, который, в сочетании с хемометрикой, позволяет обнаруживать и определять количественно бактерии, содержащиеся в молоке [29].

Молоко – прекрасная среда для размножения микроорганизмов. Обычно источником микробной контаминации сырого молока являются экскременты животных на ферме. На степень загрязненности сырого молока больше всего влияют качество кормов животных и санитарно-гигиенические условия при дойке коров. По санитарно-гигиеническим нормативам, в сыром молоке допускается присутствие культивируемых бактерий-мезофилов (аэробов и факультативных анаэробов) не более 1×10^5 КОЕ/мл. Микрофлора сырого молока представлена, как правило, не только мезофиль-

ными организмами (*Lactococcus lactis* и другие молочнокислые бактерии), но также психрофильными бактериями родов *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, а также дрожжами [30]. Кроме того, как из сырого молока, так и из молочных продуктов, прошедших пастеризацию, могут быть выделены термотолерантные спорообразующие микроорганизмы: бактерии родов *Microbacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium* и *Clostridium*, а также вида *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* [31].

Микробиологическая порча молока обусловлена ферментативной активностью бактерий, которые продуцируют протеазы и липазы, разлагающие белки, жиры и фосфолипиды молока – например, псевдомонады видов *P. fluorescens*, *P. lundensis* и *P. fragi* [32]. Во время холодильного хранения пастеризованного молока и молочных продуктов микробиологическая порча может быть вызвана психрофильными бактериями родов *Bacillus*, *Brachybacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Paenibacillus* и *Macroccoccus*, которые также вырабатывают ферменты протеазы и пептидазы [33]. Описаны случаи, когда порча молочных продуктов была вызвана дрожжами родов *Candida*, *Kluyveromyces fragilis*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Debaryomyces* и *Sporobolomyces* [34]. Прогоркание сливочного масла может быть вызвано психрофильными бактериями из рода псевдомонад (*P. fragi* и *P. putrefaciens*), а также бактериями родов *Micrococcus* и *Alcaligenes* [35].

Особую опасность для здоровья людей представляет контаминация молочных продуктов патогенными микроорганизмами, вызывающими пищевые отравления. Так, наиболее распространенными патогенами, выделяемыми из молочных емкостей на фермах в США в 2000–2008 гг., являлись *Listeria monocytogenes* (3–7%), *Salmonella spp.* (0–11%), *Campylobacter jejuni* (2–9%), *Yersinia enterocolitica* (1–6%), *Escherichia coli* серотипа O157:H7 (0–1%) и шига-токсин продуцирующие *Escherichia coli* (STEC) не-O157:H7 серотипа (2–4%). Кроме того, в этих емкостях присутствовали бактерии – возбудители мастита коров *Staphylococcus aureus* (27–42%), коагулазонегативные *Staphylococcus spp.* (>74%) и *Streptococci* (>71%), в том числе *Streptococcus agalactiae* (10%). В этот период времени среди населения наиболее часто возникали вспышки пищевых инфекций, вызванные возбудителями четырех видов: *Salmonella spp.* (202 случая), *Campylobacter spp.* (197 случаев), энтерогеморрагическими *Escherichia coli* (EHEC) серотипа O157:H7 (24 случая) и *L. monocytogenes* (23 случая). Было показано, что вспышки инфекций, связанные с потреблением сырого молока ($n = 12$), происходили значительно чаще, чем вспышки, связанные с потреблением пастеризованного молока ($n = 2$) [36]. Начиная с 1917 г. в США и других регионах мира постепенно внедрялись и совершенствовались методы пастеризации, что улучшило безопасность и качество молока и молочных продуктов. Помимо пастеризации, важную роль в улучшении качества и микробиологической безопасности молока сыграли и другие стратегии, направленные на снижение микробной контаминации молочных продуктов: улучшение здоровья молочного стада, тестирование сырого молока, внедрение чистых технологий на местах. Однако, несмотря на

огромные успехи в снижении рисков микробиологической безопасности и микробиологической порчи, молочная промышленность по-прежнему сталкивается с важными проблемами, среди которых – необходимость совершенствования научно обоснованных стратегий обеспечения безопасности не подвергаемых термической обработке сыров; предотвращение вторичного загрязнения готовых молочных продуктов; контроль спорообразующих микроорганизмов, патогенных для человека и вызывающих порчу молочных продуктов [37].

До 1917 г. актуальными для молочной промышленности были признаны несколько бактериальных патогенов, в том числе *Mycobacterium spp.* [38], *Salmonella spp.* и *Brucella spp.* Бруцеллез до сих пор представляет собой большую опасность – это хроническое инфекционное заболевание ассоциировано с потреблением козьего молока, вызывается грамотрицательными кокко-бациллами *Brucella melitensis*, которые могут присутствовать в молоке больных животных. Это заболевание достаточно часто проявляется серьезными осложнениями в виде мышечных болей, аборт, эндокардитов, депрессии, анорексии и, в некоторых случаях, смертельного исхода. Несмотря на то что бруцеллез успешно контролируется в большинстве промышленно развитых стран, он по-прежнему является проблемой в странах Средиземноморского региона, на Ближнем Востоке, в Центральной и Юго-Восточной Азии (включая Индию и Китай), в Африке к югу от Сахары и в некоторых районах Латинской Америки, где примерно 3,5 млрд человек находятся в группе риска [39].

В середине 1980-х гг. к списку патогенов, ассоциированных с молочными продуктами, была добавлена *Listeria monocytogenes* – после двух крупных вспышек листериоза в Европе и в США, которые были вызваны потреблением контаминированных листериями сыров. *L. monocytogenes* имеет давнюю историю, связанную с молоком и молочными продуктами, в том числе – вызванные этими бактериями случаи тяжелых инфекций (менингиты, аборт) как у крупного рогатого скота, так и у людей [40].

Недавно в качестве ключевых патогенов, связанных с молочными продуктами, были признаны *Cronobacter* и шига-токсинпродуцирующие *E. coli* (STEC). *Cronobacter spp.*, которые ранее идентифицировали как *Enterobacter sakazakii*, являются особой проблемой для производства сухих детских смесей. STEC и EHEC, включая *E. coli* серотипа O157:H7, вызывающие энтерогеморрагические колиты и гемолитико-уремический синдром (ГУС), также признаны актуальными патогенами для молочной промышленности [37]. Особую опасность потребление контаминированного патогенами молока представляет для детей младше 5 лет. Примером может служить вспышка пищевой инфекции в Санкт-Петербурге в 2013 г., вызванная потреблением сырого молока, обсемененного STEC, в ходе которой 1 ребенок умер [41].

Достаточно значимыми возбудителями пищевых инфекций, связанных с потреблением молочных продуктов, являются представители рода *Campylobacter*, хотя эти бактерии чаще вызывают вспышки пищевых инфекций через потребление обсемененного мяса домашней птицы. Зарегистрированные «молочные» вспышки, вызванные кампилобактериями, немногочисленны, причем они имели место в соци-

ально или географически обособленных группах населения, практикующих потребление сырого непастеризованного молока, в также в образовательных учреждениях – при нарушении режима пастеризации [42]. *Campylobacter fetus*, первичный резервуар которых – желудочно-кишечные тракты крупного рогатого скота и овец, редко поражает людей, но если это случается, то инфекция протекает тяжело, иногда со смертельным исходом. Источником инфекции зачастую является овечье молоко, переработанное в незрелый сыр [43].

Большую роль в порче молочных продуктов играют анаэробные споровые бактерии рода *Clostridium* – *Clostridium perfringens* и *Clostridium botulinum*, способные выжить в вакуумной упаковке, так как стандартная процедура пастеризации молока не убивает их споры. Эти бактерии часто являются причиной тяжелых массовых пищевых отравлений людей [44]. Другие споровые бактерии – представители родов *Bacillus* и *Paenibacillus* – вызывают пищевые отравления в более легкой форме – диарею – у людей, потреблявших контаминированные ими молочные продукты [45].

Хранение молочных продуктов на холоде, с одной стороны, продлевает срок сохранности их качества и безопасности, а с другой стороны – при наличии контаминации психрофильными бактериями – способствует накоплению в них термостабильных ферментов, вызывающих порчу этих про-

дуктов. Для предотвращения размножения психрофильных бактерий в молочных продуктах используется их хранение в газовой среде азота. Азот ингибирует бактериальный рост, в том числе психрофильных псевдомонад, что доказано как в лабораторных, так и в пилотных испытаниях этого метода. Сравнение холодового хранения сырого молока в воздушной и азотной средах показало существенное преимущество последнего для сохранения в течение по крайней мере 7 дней композиционного состава фосфолипидов сырого молока, а также его бактериологических, технологических и диетических свойств [46].

Морепродукты

К морепродуктам относят рыбу, ракообразных и моллюсков (пресноводных и морских). Микробный состав свежих морепродуктов в большой степени соотносится с микробиотой вод, из которых они выловлены. Как и мясо животных, внутренние ткани здоровой рыбы практически стерильны; нормальная микробиота живой рыбы локализуется в трех сайтах тела: слизи, покрывающей тело, жабрах и кишечнике. Микробиота пресноводных рыб и рыб теплых морских вод, как правило, состоит из большого количества мезофильных грамположительных бактерий, а рыбы холодных вод – преимущественно из грамотрицательных бактерий.

Микроорганизмы, вызывающие порчу морепродуктов, попадают в морепродукты на разных стадиях их обработки и хранения. Бактериальная биота испорченной свежемороженой рыбы состоит в основном из аспорогенных грамотрицательных палочек родов *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Shewanella* и *Acinetobacter* (табл. 2) [14]. В рыбе, хранящейся на льду, можно обнаружить представителей семейства *Enterobacteriaceae*, включая *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Rahnella aquatilis*, *Moellerella wisconsensis*, *Hafnia alvei*, *Enterobacter cloacae* и *Citrobacter freundii* [47, 48]. В испорченных тушках северных морских рыб (трески, морского языка, палтуса, хека и др.) зачастую присутствуют бактерии рода *Moraxella* [49]; соленая и высушенная рыба подвергается порче в основном грибами, а также бактериями рода *Psychrobacter* [50]. В рыбе, хранящейся на льду в вакуумной упаковке, зафиксировано присутствие светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum* и *Shewanella putrefaciens*, которые способны вызвать пищевые отравления людей, например, отравление рыбным гистамином из сушеных сардин в Японии в 2002 г. [51].

Морепродукты из ракообразных (креветки, омары, крабы, langoustы и др.) могут подвергнуться микробиологической порче, вызванной бактериями родов *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Proteus* и некоторыми видами дрожжей. Другие морепродукты (устрицы, моллюски, кальмары и гребешки), значительно отличающиеся по своему химическому составу от рыб и ракообразных (высоким уровнем углеводов и низким содержанием общего азота), в испорченных образцах содержат бактерии родов *Serratia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium* и *Micrococcus* [52]. Иногда с потреблением испорченных морепродуктов связывают вспышки гастроэнтеритов, вызванные бактериями рода *Vibrio*. В Японии пищевые отравления этого типа составляют 24% от общего количества пищевых отравлений [53].

Таблица 2. Роды бактерий, дрожжей и плесневых грибов, наиболее часто обнаруживаемых в рыбных продуктах и морепродуктах [14]

Грамотрицательные бактерии	
<i>Acinetobacter</i>	x
<i>Aeromonas</i>	xx
<i>Alcaligenes</i>	x
<i>Enterobacter</i>	x
<i>Escherichia</i>	x
<i>Flavobacterium</i>	x
<i>Moraxella</i>	x
<i>Photobacterium</i>	x
<i>Pseudomonas</i>	xx
<i>Psychrobacter</i>	x
<i>Shewanella</i>	xx
<i>Vibrio</i>	xx
<i>Pseudoalteromonas</i>	x
Грамположительные бактерии	
<i>Bacillus</i>	x
<i>Corynebacterium</i>	x
<i>Enterococcus</i>	x
<i>Lactobacillus</i>	x
<i>Listeria</i>	x
<i>Microbacterium</i>	x
<i>Weissella</i>	x
Дрожжи	
<i>Candida</i>	xx
<i>Cryptococcus</i>	xx
<i>Debaryomyces</i>	x
<i>Hansenula</i>	x
<i>Pichia</i>	x
<i>Rhodotorula</i>	xx
<i>Sporobolomyces</i>	x
<i>Trichosporon</i>	x
Плесневые грибы	
<i>Aspergillus</i>	x
<i>Aureobasidium (Pullularia)</i>	xx
<i>Penicillium</i>	x
<i>Scopulariopsis</i>	x
«xx» – выявляются чаще всего; «x» – могут встречаться; «–» – не встречаются.	

Овощи и фрукты

Во фруктах содержится большое количество сахаров, макро- и микроэлементов, витаминов, их состав подходит для роста и размножения бактерий, дрожжей и плесеней. Однако значение pH фруктов ниже уровня, благоприятного для бактерий, поэтому в их порче преобладают дрожжи и плесени. Большое разнообразие видов дрожжей выделено и идентифицировано из фруктов и с фруктовых деревьев. Исключением являются груши, которые часто подвергаются гнилостной порче бактериями из рода *Erwinia*.

Эрвинии (*Erwinia carotovora*) также являются важнейшими бактериями, вызывающими порчу овощей (репчатого лука, чеснока, спаржи, зеленых бобов, моркови, пастернака, сельдерея, салата-латука, капусты, картофеля, шпината, брюссельской и цветной капусты, огурцов, сладкого перца и др.). Под их воздействием, в результате активности пектин-метаболизирующих ферментов, образуется мягкая гниль. Такого рода порча овощей может быть вызвана и пектолитическими псевдомонадами (например, *P. marginalis*, *P. fluorescens*, *P. viridiflava* и др.), которые составляют до 40% от общей численности аэробных микроорганизмов, выделяемых из разных типов овощей. Именно с такими бактериями связано 43% послеуборочной гнили свежих сельхозпродуктов при холодильном хранении [54].

Сырые овощи, в частности картофель, бывают подвержены мягкой гнили, вызываемой *Clostridium puniceum* и другими видами клостридий. Самое большое беспокойство из всех клостридий вызывают *C. botulinum* и *C. perfringens*, которые способны выживать и размножаться в вакуумной упаковке, вызывая порчу продуктов благодаря своей газообразующей способности и протеолитической активности [55].

Слабокислые пищевые продукты (консервированная сладкая кукуруза, зеленый горошек, грибы, спаржа и др.) могут быть испорчены в результате активности термофильных анаэробных бактерий, таких как *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* и *Desulfotomaculum nigrificans* [56]. Консервированные овощи могут портиться под воздействием лактобактерий, продуцирующих диоксид углерода, который вызывает вздутие консервных банок. Молочнокислые бактерии ответственны почти за 25% случаев порчи овощных пресервов, в которых в качестве консерванта используется уксусная кислота [57], в остальных случаях порчи консервированных фруктов и овощей, связанных с газообразованием, были выделены бактерии *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus licheniformis* и *Geobacillus stearothermophilus* [7]. Исследователями из США опубликованы данные о выделении микобактерий из свежих фруктов и соков: *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium flavescens* и др., имеющих определенную клиническую значимость в качестве возбудителей инфекций у человека [7].

Фруктовые и овощные продукты с высоким содержанием сахара и соли (соки, их концентраты, сухофрукты, пресервы, джемы и др.) подвергаются микробиологической порче со стороны дрожжей (родов *Zygosaccharomyces*, *Lachancea*, *Torulaspora* и *Zygotorulaspora*), которые хотя и не производят токсинов и не зафиксированы как возбудители заболеваний человека, могут вызвать такие изменения в продуктах, из-за

которых они становятся оптимальной средой для размножения патогенных и токсигенных микроорганизмов [7, 58].

Особую опасность для здоровья потребителей представляет контаминация фруктов и овощей патогенными энтеробактериями, такими как сальмонеллы, диарогенные эшерихии, иерсинии и листерии, которые вызывают инфекции с высоким уровнем смертности. Описаны случаи спорадических и вспышечных заболеваний, вызванных этими возбудителями, в результате потребления листовых овощей, помидоров, огурцов и др. [59–62]. Данные бактерии обладают способностью выживать и размножаться в экстремальных условиях окружающей среды. Например, сальмонеллы серотипов *Enteritidis*, *Infantis* и *Typhimurium* способны расти при температурах 10–12°C на помидорах при низких значениях pH среды (~4) [63]. Шига-токсин (веротоксин) продуцирующие *E. coli* (STEC/VTEC), несмотря на то, что их первичным хозяином является крупный рогатый скот, способны колонизировать растения в качестве альтернативного хозяина. Зафиксированы вспышки пищевых инфекций, ассоциированные с потреблением проростков семян, люцерны, клевера, пажитника, побегов белой редиски и др., вызванные бактериями STEC серотипов O157, O104, O26, O121, O126 и др. [64]. Иерсиниозы, вызванные бактериями *Yersinia enterocolitica* серотипов O3 и O9, чаще фиксировавшиеся как спорадические случаи, реже – в виде вспышек пищевых инфекций, были связаны с потреблением овощей и фруктов в виде готовых салатов [65]. Способность к персистенции в условиях окружающей среды в течение нескольких лет и даже десятилетий, в том числе на овощах и фруктах, характерна для грамположительных бактерий *Listeria monocytogenes*, которые способны вызвать инвазивные заболевания у людей с ослабленной иммунной системой с уровнем смертности 20–30% [66].

Перспективные подходы для борьбы с микробной порчей продуктов

Качество пищевых продуктов строго регламентируется нормативными актами. В нашей стране микробиологические исследования пищевых продуктов проводят в соответствии с Техническими регламентами Таможенного Союза (ТР ТС), Государственными стандартами (ГОСТами), Санитарно-эпидемиологическими правилами и нормативами (СанПиНами), Методическими указаниями (МУ) и другими нормативными документами (https://www.pitportal.ru/new_articles/4337.html). Безопасность пищевых продуктов достигается с помощью разнообразных традиционных методов, в разной степени обеспечивающих контроль их порчи в результате размножения микроорганизмов: физических методов (высушивание; хранение в регулируемой газовой среде и вакууме; тепловая обработка – пастеризация и стерилизация; охлаждение; обработка ультрафиолетовым и рентгеновским излучением); химических методов (обработка антибактериальными консервирующими препаратами – кислотами, солями, спиртами, диоксидом серы, сульфитами и др.) и биологических методов (обработка антибактериальными препаратами микробного происхождения, например, низином или педиоцином PA1; внесение фитонцидов, содержащихся в луке, чесноке, хрене, горчице и других растениях) [67].

Относительно новым подходом к обеспечению безопасности и стабильности свойств пищевых продуктов является разработка прогностических моделей развития микроорганизмов, вызывающих их порчу. Компьютерные прогностические модели и базы данных по размножению, инактивации и выживанию микроорганизмов используют для оценки скорости размножения бактерий на разных стадиях производственного процесса, для определения срока годности продукта и для тестирования его качества. Модели прогностической микробиологии широко используются в развитых странах промышленными предприятиями, образовательными учреждениями и государственными контрольно-регламентирующими органами [7].

Бактериоцины

В последние годы бактериоцины привлекают пристальное внимание специалистов как перспективные натуральные безопасные пищевые консерванты, поскольку они легко усваиваются желудочно-кишечным трактом человека и удовлетворяют требованиям, предъявляемым к безопасным продуктам, производимым без использования химических консервантов [68]. На основании доступных сведений, в настоящее время официально разрешены для практического использования только два препарата этого класса – низин и педиоцин РА1. Примерами наиболее перспективных препаратов бактериоцинов, находящихся на стадии разработки, являются энтероцин AS-48 и лактицин 3147 [69, 70].

Бактериоцины показали свою эффективность для обработки разных типов продуктов питания: мяса, молочных продуктов, рыбы, алкогольных напитков, салатов и ферментированных овощей. Однако эффективность бактериоцинов в пищевых системах зачастую снижается из-за таких факторов, как адсорбция их некоторыми компонентами пищевых продуктов, ферментативная деградация, слабая растворимость и неравномерное распределение в пищевой матрице. Влияние этих факторов может быть преодолено использованием не собственно бактериоцинов, а живых бактериоцино продуцирующих бактерий. Например, включение бактерий-продуцентов бактериоцинов в молочные продукты (йогурты, сыры) в качестве вспомогательных культур при ферментации обеспечивает непрерывную наработку бактериоцинов и улучшает сохранность этих продуктов во время созревания и хранения. Кроме того, молекулы бактериоцинов могут быть защищены от разрушения путем включения их в состав биопленок и «активной» упаковки [71]. Эффективность их действия может быть повышена при сочетании бактериоцинов с химическими добавками (этилендиаминтетрауксусной кислотой, лактатом натрия, диацетатом калия и др.), с прогревом продукта или с обработкой высоким давлением [72].

Разработан биоинженерный подход использования бактериоцинов – наработка этих антибактериальных веществ в генетически модифицированных растениях. Недавно показано, что некоторые колицины очень эффективно продуцируются в листьях табака, шпината и листовой свеклы. Смесь колицина М и колицина Е7 проявляла высокую антибактериальную активность против энтерогеморрагических *Escherichia coli* (ЕНЕС) – внесение 10 мг/л колицинов в бульонную культуру снижало бактериальную нагрузку патогенов на 2–6 порядков. Предлагается широко использовать

колицины, продуцируемые клетками растений, для контроля патогенных *E. coli* в пищевых продуктах как растительного, так и животного происхождения [73]. Другим успешным примером данного подхода явилась система экспрессии в растениях 6 пиоцинов (S5, РаеМ, L1, L2, L3 и РаеМ4), которые специфично подавляли размножение клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa* не только *in vitro* в жидкой культуре и в составе биопленок, но также *in vivo* на инфекционной модели личинок восковой моли *Galleria mellonella* [74].

Бактериофаги

В ряде исследований представлены данные об успешном использовании литических бактериофагов вирусов бактерий для инактивации основных возбудителей пищевых инфекций: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Shigella spp.*, *Campylobacter jejuni* и *Cronobacter sakazakii* (*Enterobacter sakazakii*), а также бактерий, вызывающих микробиологическую порчу продуктов, как в организме модельных животных, так и на поверхностях, контактирующих с пищевыми продуктами или в составе бактериальных биопленок. Метод фаговой терапии представлен в качестве одного из перспективных, «новых» методов лечения бактериальных инфекций, на Генеральной Ассамблее ООН в 2016 г. [75]. Преимуществом литических бактериофагов является их специфичность в отношении целевой популяции бактерий без воздействия на представителей других видов микробиоты [76, 77]. Бактериофаги расцениваются как безопасные агенты для обработки пищевых продуктов благодаря отсутствию у них токсичности для организма человека. Бактериофаги обладают большим потенциалом для медицины и ветеринарии, но к настоящему времени в Европе и США коммерциализированы и одобрены для применения в пищевых продуктах или для деконтаминации поверхностей только фаговые препараты, активные против *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 и *S. enterica*.

В Российской Федерации недавно внедрен специализированный профилактический продукт «Фудфаг» на основе коктейля бактериофагов эшерихиозного, сальмонеллезного, листериозного и стафилококкового, существенно снижающий риск заражения людей острыми кишечными инфекциями [78]. Кроме того, разработаны препараты для фаг-опосредованного биопроцессинга, деконтаминации и продления срока годности молока, мясного фарша, куриных полуфабрикатов и рыбы [79].

Перспективным направлением использования бактериофагов является их применение в иммобилизованном состоянии на носителях, что позволяет предотвратить возможную потерю фаговой активности и обеспечивает постепенное высвобождение частиц бактериофага в пищевой продукт. Для профилактики STEC-инфекций предложен бактериофаг, иммобилизованный на органо-неорганических гибридных покрытиях, совместно с наночастицами оксидов металлов; при этом зафиксирован синергидный антибактериальный эффект наноповрхностей и бактериофагов против бактериальных патогенов [80]. Недавно разработаны варианты упаковки для продуктов на основе целлюлозных мембран, пропитанных суспензией бактериофагов и с инкапсулированными фагами в альгинатных шариках [81], на основе пленки из хитозана, содержащей липосомные капсулы фагов [82].

Ферменты бактериофагов

В геномах бактериофагов имеются гены, кодирующие ферменты эндолизины, вызывающие лизис клетки-хозяина на завершающем этапе литической инфекции. Эти ферменты возможно использовать в качестве антибактериальных агентов. Очищенные фаговые эндолизины имеют более широкий спектр специфичности, чем литические бактериофаги, из которых они выделены [83]. Препараты рекомбинантных эндолизинов предлагается использовать в качестве естественных консервантов продуктов питания как самостоятельно, так и в сочетании с другими антимикробными препаратами (например, с низином) или с другими методами обработки (например, высоким гидростатическим давлением) [84, 85].

Эффективная доставка эндолизинов к мишени действия в обрабатываемом продукте является существенным моментом, и решается она с помощью генно-инженерных технологий. Так, для обеспечения оптимального способа доставки антистафилококкового эндолизина *Lysdb* при производстве сыра был сконструирован стартовый биотехнологический штамм *Lactobacillus casei*, клетки которого конститутивно синтезируют эндолизин [86]. Успешным в этом плане направлением оказался биоинженерный подход наработки эндолизинов в генетически модифицированных растениях. Проходят испытания 6 субстанций, синтезируемых в листьях табака, активных против патогенных *Clostridium perfringens*. Показано, что эти препараты предотвращают размножение бактерий *C. perfringens* на мясных матрицах гораздо лучше, чем низин, единственный к настоящему времени официально одобренный для контроля клостридий консервант на основе бактериоцина [87].

Эфирные масла

Эфирные масла (ЭМ) представляют собой жидкие ароматические продукты, экстрагированные из ароматических растений (*Lamiaceae*), растворимые в липидах и в органических растворителях. Они играют ключевую роль в защите растений от бактерий, грибов, вирусов, насекомых и животных [88]. ЭМ использовались человеком для терапевтических целей с незапамятных времен, но только в последние годы появились сообщения об их антимикробной активности, способности ингибировать патогенные бактерии и увеличивать срок годности пищевых продуктов [89, 90]. К сожалению, эффективность ЭМ может снижаться из-за присутствия в пищевых продуктах таких компонентов, как жир, углеводороды, белки, вода, соль, антиоксиданты и другие, а также из-за pH среды. Было отмечено, что ЭМ не очень активны в продуктах с высокой концентрацией сложных сахаров (крахмал), поэтому препараты ЭМ предпочтительно использовать для обработки пищевых продуктов, содержащих простые, а не сложные углеводы [91].

Наибольшей биологической активностью обладают ЭМ, в которых основными компонентами являются альдегиды или фенолы (циннамальдегид, цитрал, карвакрол, эвгенол или тимол), а затем – терпены и спирты [92]. Карвакрол – фенольный монотерпеноид, содержащийся в эфирных маслах орегано (*Origanum vulgare*), тимьяне (*Thymus vulgaris*), клоповнике (*Lepidium flavum*), диком бергамоте (*Citrus aurantium bergamia*) и других растениях. Антимикробная активность карвакрола выше, чем у других летучих соединений, присутствующих в эфирных маслах, из-за гидрофобности молекулы, наличия в ней свободной гидроксильной

группы и фенольной частицы. Карвакрол особенно эффективен против возбудителей пищевых инфекций, включая *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* и *Bacillus cereus* [93]. Фитол – ациклический мононенасыщенный спирт дитерпена, самый распространенный ациклический изопреноид. Он содержится в эфирных маслах жгучих растений, таких как перец бетель (*Piper betle*), клеоме зазубренная (*Cleome serrate*) и лантана радула (*Lantana radula*). Это природное соединение проявляет биологическую активность широкого спектра, включая противовоспалительную, антимикробную, противоаллергическую, иммуностимулирующую и антиоксидантную [94]. Целый комплекс антимикробных веществ обнаружен в эфирном масле «чесночного растения» *Gallesia integrifolia* (сем. *Phytolaccaceae*), произрастающего в Бразилии. В этом эфирном масле идентифицированы 35 компонентов, 68% которых принадлежали к классу сероорганических соединений. Показано, что это эфирное масло обладает сильным антимикробным действием против грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium* и *Trichoderma* [95]. Примечательно, что даже бактерии *C. perfringens*, способные образовывать высокотермостойкие споры, могут быть инактивированы препаратами ЭМ. Установлено, что аллилизотиоцианат (аллиловое горчичное масло, сильный лакриматор) эффективно подавляет прорастание спор и размножение вегетативных клеток *C. perfringens* как на искусственных питательных средах, так и в курином мясе [96].

Повышение эффективности ЭМ и пролонгирование их действия могут быть достигнуты за счет включения препаратов ЭМ в нанолипосомы. Так, значения минимальных подавляющих концентраций (МПК) эфирного масла растения *Zataria multiflora*, произрастающего в предгорьях Турции, Ирака, Ирана и других стран, против шига-токсинпродуцирующих *E. coli* O157:H7 снижались при инкапсулировании в 2 раза. Интересно, что использование инкапсулированных ЭМ в субингибирующих концентрациях (50 и 75% от МПК) приводило к существенно более значительному, статистически достоверному, снижению экспрессии шига-токсина *Stx2* в клетках *E. coli* O157:H7 (на 10%), по сравнению с таковым при использовании неинкапсулированного ЭМ [97].

Продемонстрирована возможность успешного применения препаратов ЭМ растений в комбинации с бактериоцинами и антибиотиками. Например, эфирное масло чеснока и аллилизотиоцианат, совместно с низином, были использованы для обработки свежей колбасы против контаминации бактериями *E. coli* O157:H7 и *Lactobacillus plantarum*. Показано, что такая обработка была эффективна для повышения безопасности и срока годности свежей колбасы, не влияя на органолептические свойства продукта [98]. Другой пример – комбинация ЭМ тимьяна и перечной мяты с ципрофлоксацином была эффективной для ингибирования и эрадикации биопленок, образованных мультирезистентными *Klebsiella pneumoniae* [99]. А комбинация фитола с цефотаксимом на 70% снижала эффективность формирования биопленки *Acinetobacter baumannii* [94].

Заключение

Микробиологическая порча пищевых продуктов и связанные с этим пищевые отравления людей могут иметь серьезные последствия для здравоохранения и экономики челове-

ческого общества. Практически все виды пищевых продуктов могут подвергаться микробиологической порче, но существует специфика этого процесса для разных типов пищевых продуктов. Для обеспечения безопасности пищевых продуктов используются разнообразные традиционные методы: физические, химические и биологические. В последние годы активно разрабатываются новые методы, сочетающие в себе традиционные и инновационные разработки.

Использование бактериоцинов, бактериофагов, эндолизинов и фитонцидов для биоконсервации пищевых продуктов – многообещающее новое направление для пищевой промышленности. Специалисты полагают, что бактериоцины и эндолизины более пригодны для создания новых высокодействующих вариантов препаратов с расширенным спектром активности с помощью генно-инженерных технологий. Генетически модифицированные бактериофаги также могут быть полезны для создания таких препаратов, но работа с ними осложняется быстрым формированием устойчивости к ним микроорганизмов, вызывающих порчу пищевых продуктов. Широко используется комплексный подход к созданию новых технологий хранения продуктов: бактериоцины и фитонциды рассматриваются как перспективные антимикробные агенты при создании барьеров против микробной контаминации путем включения их в упаковочные пленки, в сочетании с использованием модифицированных газовых смесей при упаковке; фаги и эндолизины успешно сочетаются с низином, а высокое гидростатическое давление усиливает активность эндолизина. Все это позволяет надеяться, что в ближайшем будущем будут созданы новые биологические консерванты пищевых продуктов, и пищевая индустрия выйдет на новый уровень сохранности и безопасности продукции.

Литература/References

1. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. WHO Press, 2015. ISBN 978 92 4 156516 5. Available on the WHO website (www.who.int).
2. Шепелин АП, Дятлов ИА, Полосенко ОВ. Микробиологический контроль качества пищевой продукции. Бактериология. 2017;2(2):39-47. / Shepelin AP, Dyatlov IA, Polosenko OV. Microbiological control of food products quality. Bacteriology. 2017;2(2):39-47. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-39-47 (In Russian).
3. Шевелева СА. Анализ микробиологического риска как основа для совершенствования системы безопасности и контроля пищевых продуктов. Автореф. дисс. ... доктора мед. наук. Москва, 2007. / Sheveleva SA. Analysis of microbiological risk as a basis for improving the safety and control of food. Thesis of PhD dissertation in Medical Science. Moscow, 2007. (In Russian).
4. Фролов ДИ. Актуальность микробиологических испытаний готовой продукции в области управления пищевой безопасностью. Инновационная техника и технология. 2016;1(6):15-18. / Frolov DI. The relevance of microbiological testing of finished products in the field of food safety management. Innovative Machinery and Technology. 2016;1(6):15-18. (In Russian).
5. Донченко ЛВ, Надыкта ВД. Безопасность пищевой продукции. 3-е изд., испр. и доп. М.: Издательство Юрайт, 2018, 264 с. ISBN 978-5-534-07799-5. / Donchenko LV, Nadykta VD. Food safety. 3rd ed., Rev. and additional. Moscow: "Yurait" Publ., 2018, 264 p. ISBN 978-5-534-07799-5. (In Russian).
6. Правительство Российской Федерации. Распоряжение № 1364-п от 29 июня 2016 г. «Об утверждении Стратегии повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 г.». <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71335844/> / The Government of the Russian Federation. Order No. 1364-p of June 29, 2016 «On the Approval of the Strategy for Improving the Quality of Food Products in the Russian Federation until 2030». <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71335844/> (In Russian).
7. Blackburn CW. Food spoilage microorganisms. Ed. C. de W. Blackburn. Cambridge: Woodhead Publishing, 2006, 712 p. ISBN: 9781855739666.
8. Huis in't Veld JH. Microbial and Biochemical spoilage of foods: an overview. Int J Food Microbiol. 1996;33(1):1-18.
9. Braden CR, Tauxe RV. Emerging trends in foodborne diseases. Infect Dis Clin North Am. 2013 Sep;27(3):517-33. DOI: 10.1016/j.idc.2013.06.001.
10. Berger CN, Sodha SV, Shaw RK, Griffin PM, Pink D, Hand P, Frankel G. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. Environ Microbiol. 2010 Sep;12(9):2385-97. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x
11. Luzina NI. Microbiology of meat and meat products. Tutorial. Kemerovo: Kemerovo Technological Institute of Food Industry, 2004, 75 с. ISBN 5 89289 210 - 7. (In Russian).
12. Doronin AF, Izotova TI, Dvoenosova PA. Ensuring the safety and quality of meat and meat products. Tutorial. M.: Publishing complex of Moscow State University of Food Production, 2009, 232 p. (In Russian).
13. Aliyeva AK, Dmitrichenko MI, Pelenko VV. Microbiological safety and quality control of poultry products sold in the trade networks of St. Petersburg and the Leningrad region. Annals of Voronezh State University of Engineering Technologies. 2017;79(1):290-296. (In Russian).
14. Stenbridge LN, Davies AR. The Microbiology of Meat and Poultry. Davies A, Board R. (eds). London: Blackie Academic & Professional, 1998. p. 174-219.
15. Gill CO, Harrison JC, Penney N. The storage life of chicken carcasses packaged under carbon dioxide. Int J Food Microbiol. 1990;11(2):151-7.
16. Garcia C, Martin A, Timon ML, Cordoba JJ. Microbial populations and volatile compounds in the "bone taint" spoilage of dry cured ham. Lett Appl Microbiol. 2000;30(1):61-6.
17. Mattick KL, Bailey RA, Jorgensen FA, Humphrey TJ. The prevalence and number of Salmonella in sausages and their destruction by frying, grilling or barbecuing. J Appl Microbiol. 2002;93:541-547.
18. Loureiro V, Querol A. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. Trends Food Sci Technol. 1999;10:356-65.
19. Пleshakova VI, Balashov VB, Stepanov DN. Видовой состав и этиологическая структура возбудителей инфекционных болезней кур в условиях промышленного производства. Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2014;217:211-216. / Pleshakova VI, Balashov VV, Stepanov DN. Species composition and etiological structure of causative agents of infectious diseases of poultry in conditions of industrial production. Scientific notes of the Kazan State Academy of Veterinary Medicine behalf of N.E. Bauman. 2014;217:211-216. (In Russian).
20. Гусев ВИ, Светоч ЭА, Глазков НА, Теймуразов МГ. К вопросу контроля возбудителей бактериальных инфекций в промышленном птицеводстве. Птица и птицепродукты. 2003;2:23-25. / Gusev VI, Candle EA, Glazkov NA, Teimurazov MG. To the issue of control of pathogens of bacterial infections in industrial poultry farming. Poultry and poultry products. 2003;2:23-25. (In Russian).
21. Abeyrathne EDNS, Huang X, Ahn DU. Antioxidant, angiotensin-converting enzyme inhibitory activity and other functional properties of egg white proteins and their derived peptides - A review. Poult Sci. 2018 Apr 1;97(4):1462-1468. DOI: 10.3382/ps/pex399.
22. Фисинин ВИ, Егоров ИА, Лаптев ГЮ, Ильина НА, Йылдырым ЕА, Филиппова ВА, и др. Выявление микроорганизмов в куриных эмбрионах методом T-RFLP. Птица и птицепродукты. 2015;624-626. / Fisinin VI, Egorov IA, Laptev GY, Iilina NA, Yildirim EA, Filippova VA, et al. Identification of microorganisms in chick embryos by the T-RFLP method. Poultry and poultry products. 2015;624-626. (In Russian).

23. Фисинин ВИ, Лаптев ГЮ, Никонов НН, Ильина ЛА, Ёылдырым ЕА, Филиппова ЕА, и др. Изменение бактериального сообщества в желудочно-кишечном тракте кур в онтогенезе. Сельскохозяйственная биология. 2016;51(6):883-890. / Fisinin VI, Laptev GYu, Nikonov NN, Il'ina LA, Yildirim EA, Filippova VA, et al. Poultry gastrointestinal microbiome changes during ontogenesis. Sel'skokhozyaistvennaya Biologia [Agricultural Biology]. 2016;51(6):883-890. DOI: 10.15389/agrobiology.2016.6.883rus (In Russian).
24. Госманов РГ, Галиуллин АК, Нурғалиев ФМ, Волков АХ, Юсупова ГР. Микробиологический контроль мяса животных, кур, яиц и продуктов их переработки. Учебно-методическое пособие. Казань: ФГБОУ ВО Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана, 2016, 59 с. / Gosmanov RG, Galiullin AK, Nurgaliev FM, Volkov AH, Yusupova GR. Microbiological control of meat, eggs and products of their processing. Teaching-methodical manual. Kazan: Kazan State Academy of Veterinary Medicine behalf of N.E. Bauman, 2016, 59 p. (In Russian).
25. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, et al. The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis. Clin Infect Dis. 2010 Mar 15;50(6):882-9. DOI: 10.1086/650733.
26. EFSA European Food Safety Authority; The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EFSA J 2015;13:165.
27. Board RG. Eggs and egg products. In: The Microbiological Safety and Quality of Food. Volume I. Eds. Lund BM, Baird-Parker TC, Gould W. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers, 2000, p. 590–619.
28. Lafarge V, Ogier J-C, Girard V, Maladen V, Leveau J-Y, Gruss A, et al. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. Appl Environ Microbiol. 2004;70:5644–5650.
29. Nicolaou N, Xu Y, Goodacre R. Detection and quantification of bacterial spoilage in milk and pork meat using MALDI-TOF-MS and multivariate analysis. Anal Chem. 2012 Jul 17;84(14):5951-8. DOI: 10.1021/ac300582d.
30. Chambers JV. The microbiology of raw milk. In: Robinson R K, Dairy Microbiology Handbook, 3rd ed. New York: Wiley-Interscience, 2002, p. 39-90.
31. Hayes MC, Boor KJ. Raw milk and fluid milk products. In: Marth EH, Steele JL. Appl Dairy Microbiol, 2nd ed., New York: Marcel Dekker, 2001, p. 59-76.
32. Boor KJ, Murphy SC. The Microbiology of Market Milks. In: Dairy Microbiology Handbook. 3rd Ed. Robinson RK. New York Wiley-Interscience: A John Wiley&Sons, Inc. Publication, 2002, p. 91-122.
33. Ribeiro Júnior JC, Tamanini R, de Oliveira ALM, Alfieri AA, Beloti V. Genetic diversity of thermophilic spoilage microorganisms of milk from Brazilian dairy farms. J Dairy Sci. 2018; pii: S0022-0302(18)30494-6.
34. Green MD, Ibe SN. Yeasts as primary contaminants in yogurts produced commercially in Lagos, Nigeria. J Food Protect. 1987;50:193-8.
35. Varnam AH, Sutherland JP. Milk and Milk Products: Technology, Chemistry and Microbiology. London: Chapman & Hall, 1994. ISBN 978-1-4613-5732-2.
36. Oliver SP, Boor KJ, Murphy SC, Murinda SE. Food safety hazards associated with consumption of raw milk. Foodborne Pathog Dis. 2009 Sep;6(7):793-806. DOI: 10.1089/fpd.2009.0302
37. Boor KJ, Wiedmann M, Murphy S, Alcaine S. A 100-Year Review: Microbiology and safety of milk handling. J Dairy Sci. 2017 Dec;100(12):9933-9951. DOI: 10.3168/jds.2017-12969
38. Grant IR, Hitchings EI, McCartney, Ferguson F, Rowe MT. Effect of commercial-scale high-temperature short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cow's milk. Appl Environ Microbiol. 2002;68:602-607.
39. Rossetti CA, Arenas-Gamboa AM, Maurizio E. Caprine brucellosis: A historically neglected disease with significant impact on public health. PLoS Negl Trop Dis. 2017 Aug 17;11(8):e0005692. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005692
40. Jackson KA, Gould LH, Hunter JC, Kucerova Z, Jackson B. Listeriosis Outbreaks Associated with Soft Cheeses, United States, 1998-2014. Emerg Infect Dis. 2018 Jun;24(6):1116-1118. DOI: 10.3201/eid2406.171051.
41. Onishchenko GG, Dyatlov IA, Svetoch EA, Vo-lozhantsev NV, Bannov VA, Kartsev NN et al. [Molecular-genetic characterization of shiga-toxin producing *Escherichia coli* isolated during a food-borne outbreak in St. Petersburg in 2013]. Vestn Ross Akad Med Nauk. 2015;(1):70-81. (In Russian).
42. Fernandes AM, Balasegaram S, Willis C, Wimalaratna HM, Maiden MC, McCarthy ND. Partial Failure of Milk Pasteurization as a Risk for the Transmission of *Campylobacter* From Cattle to Humans. Clin Infect Dis. 2015 Sep 15;61(6):903-9. DOI: 10.1093/cid/civ431
43. Koppelaar H, Groenendijk F, van den Berge M, Verkade E, Verduin K, Zomer AL, et al. Outbreak of *Campylobacter fetus* infection after consumption of unpasteurized sheep's milk cheeses: how to trace the source? Ned Tijdschr Geneesk. 2017; 161(0):D1704. [Article in Dutch]
44. Lindström M, Myllykoski J, Sivelä S, Korkeala H. *Clostridium botulinum* in cattle and dairy products. Crit Rev Food Sci Nutr. 2010 Apr;50(4):281-304. DOI: 10.1080/10408390802544405.
45. Pruss BM, Dictrich R, Nibler B, Martibauer E, Scherer S. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. Appl Environ Microbiol. 1999;65:5436-5442.
46. Munsch-Alatossava P, Käkälä R, Ibarra D, Youbi-Idrissi M, Alatossava T. Phospholipolysis Caused by Different Types of Bacterial Phospholipases During Cold Storage of Bovine Raw Milk Is Prevented by N2 Gas Flushing. Front Microbiol. 2018 Jun 19;9:1307. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01307
47. Debevere J, Devlieghere F, van Sprundel P, De Meulenaer B. Influence of acetate and CO2 on the TMAO-reduction reaction by *Shewanella baltica*. Int J Food Microbiol. 2001;68(1-2):115-23.
48. Gonzalez-Rodriguez MN, Sanz JJ, Santos JA, Otero A, Garcia-Lopez ML. Bacteriological quality of aquacultured freshwater fish portions in prepackaged trays stored at 3 °C. J Food Protect. 2001;64:1399–1404.
49. Santos JA, Garcia-Lopez ML, Otero A. *Moraxella*. In: Encyclopaedia of Food Microbiology, Vol. 2. Eds. Robinson RK, Batt CA, Patel PD. London: Academic Press. 2000, p. 1487-1492.
50. Bjorkevoll I, Olsen RL, Skejerdal OT. Origin and spoilage of the microbiota-dominating genus *Psychrobacter* in sterile, rehydrated salt-cured and dried salt-cured cod (*Gadus mortha*). Int J Food Microbiol. 2003;84(2): 175–187.
51. Kanki M, Yoda T, Ishibashi M, Tsukamoto T. *Photobacterium phosphoreum* caused a histamine fish poisoning incident. International. J Food Microbiol. 2004;92:79–87.
52. Romero JN, Gonzales R, Espero T. Marine *Pseudoalteromonas sp.* composes most of the bacterial population developed in oysters spoiled during storage. J Food Sci. 2002;6758:2300-2303.
53. Wang R, Sun L, Wang Y, Deng Y, Fang Z, Liu Y, et al. Growth and Hemolysin Production Behavior of *Vibrio parahaemolyticus* in Different Food Matrices. J Food Prot. 2018 Feb;81(2):246-253. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-17-308
54. Jay JM. Modern Food Microbiology. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers Inc. 2000, 58 p.
55. Jong DEJ. Spoilage of an acid food product by *Clostridium perfringens*, *C. barati* and *C. butyricum*. Int J Food Microbiol. 1989;8:121-32.
56. Ashton DH. Thermophilic organisms involved in food spoilage: thermophilic anaerobes not producing hydrogen sulphide. J Food Protect. 1981;44(2): 146-8.
57. Koort JMK, Murros A, Coneye T, Eerola S, Vandamme P, Sukura A, et al. *Lactobacillus oligofermentans sp. nov.* associated with spoilage of modified atmosphere packaged poultry products. Appl Environ Microbiol. 2005;71(8):4400-6. DOI: 10.1128/AEM.71.8.4400-4406.2005
58. James SA, Stratford M. Spoilage yeasts with emphasis on the genus *Zygosaccharomyces*. In: Boekhout T., Robert V. Yeasts in Food, Beneficial and Detrimental Aspects, Hamburg: Behr's Verlag, 2003, p. 171-87.
59. Pande TK, Khan AH, Pipersania R, Sethi SK, Rath Y. Watermelon poisoning. Postgrad Med J. 2002;78:124-125.

60. Sudershan RV, Naveen Kumar R, Kashinath L, Bhaskar V, Polasa K. Microbiological hazard identification and exposure assessment of poultry products sold in various localities of Hyderabad, India. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:736040. DOI: 10.1100/2012/736040
61. Callejón RM, Rodríguez-Naranjo MI, Ubeda C, Hornedo-Ortega R, Garcia-Parrilla MC, Troncoso AM. Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States and European Union: trends and causes. *Foodborne Pathog Dis*. 2015 Jan;12(1):32-8. DOI: 10.1089/fpd.2014.1821
62. Verma P, Saharan VV, Nimesh S, Singh AP. Phenotypic and virulence traits of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains isolated from vegetables and fruits from India. *J Appl Microbiol*. 2018 Jul;125(1):270-281. DOI: 10.1111/jam.13754.
63. Gurtler JB, Harlee NA, Smelser AM, Schneider KR. *Salmonella enterica* Contamination of Market Fresh Tomatoes: A Review. *J Food Prot*. 2018 Jul;81(7):1193-1213. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-17-395
64. Wright KM, Holden NJ. Quantification and colonisation dynamics of *Escherichia coli* O157:H7 inoculation of microgreens species and plant growth substrates. *Int J Food Microbiol*. 2018 May 20;273:1-10. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.025
65. MacDonald E1, Einöder-Moreno M, Borgen K, Thorstensen Brandal L, Diab L, Fosslø Ø, et al. National outbreak of *Yersinia enterocolitica* infections in military and civilian populations associated with consumption of mixed salad, Norway, 2014. *Euro Surveill*. 2016 Aug 25;21(34). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.34.30321.
66. Leong D, NicAogáin K, Luque-Sastre L, McManamon O, Hunt K1, Alvarez-Ordóñez A, Scollard J, et al. A 3-year multi-food study of the presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in 54 small food businesses in Ireland. *Int J Food Microbiol*. 2017 May 16;249:18-26. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.015
67. Леонтьев ВН, Элькаиб ХМ, Эльхедми АЭ. Порча пищевых продуктов: виды, причины и способы предотвращения. Труды Белорус Гос Универ. 2013;8(1):125-130. / Leontiev VN, Elkaib KhM, Elhedmi AE. Food spoilage: types, causes and methods of prevention. Proceedings of Belarus State University. 2013;8(1):125-130. In Russian.
68. Mills S, Serrano LM, Griffin C, O'Connor PM, Schaad G, Bruining C, et al. Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* LMG P-26358 against *Listeria innocua* when used as an adjunct starter in the manufacture of cheese. *Microb Cell Fact*. 2011 Aug 30;10 Suppl 1:S7. DOI: 10.1186/1475-2859-10-S1-S7
69. Sánchez-Hidalgo M, Montalbán-López M, Cebrián R, Valdivia E, Martínez-Bueno M, Maqueda M. AS-48 bacteriocin: close to perfection. *Cell Mol Life Sci*. 2011 Sep;68(17):2845-57. DOI: 10.1007/s00018-011-0724-4.
70. Suda S, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Lactacin 3147--biosynthesis, molecular analysis, immunity, bioengineering and applications. *Curr Protein Pept Sci*. 2012 May;13(3):193-204.
71. Silva CCG, Silva SPM, Ribeiro SC. Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. *Front Microbiol*. 2018 Apr 9;9:594. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00594
72. Egan K, Field D, Rea MC, Ross RP, Hill C, Cotter PD. Bacteriocins: Novel Solutions to Age Old Spore-Related Problems? *Front Microbiol*. 2016 Apr 8;7:461. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00461.
73. Schulz S, Stephan A, Hahn S, Bortesi L, Jarczowski F, Bettmann U, et al. Broad and efficient control of major foodborne pathogenic strains of *Escherichia coli* by mixtures of plant-produced colicins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Oct 6;112(40):E5454-60. DOI: 10.1073/pnas.1513311112.
74. Paškevičius Š, Starkevič U, Misiūnas A, Vitkauskienė A, Gleba Y, Ražanskienė A. Plant-expressed pyocins for control of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*. 2017 Oct 3;12(10):e0185782. DOI: 10.1371/journal.pone.0185782
75. United Nations. Draft Political Declaration of the High-Level Meeting of the General Assembly on Antimicrobial Resistance (16-16108 (E)). 2016 Release. Available online: http://www.un.org/pga/71/wp-content/uploads/sites/40/2016/09/DGACM_GAEAD_ESCAB-AMR-Draft-Political-Declaration1616108E.pdf (accessed on 17 December 2017).
76. Pérez Pulido R, Grande Burgos MJ, Gálvez A, Lucas López R. Application of bacteriophages in post-harvest control of human pathogenic and food spoiling bacteria. *Crit Rev Biotechnol*. 2016 Oct;36(5):851-61. DOI: 10.3109/07388551.2015.1049935
77. Васильев ДА, Алёшкин АВ, Золотухин СН, Феоктистова НА, Мартынова КВ, Насибуллин ИР, и др. Разработка фагового биопрепарата *Aeromonas hydrophila* для деконтаминации рыбного, мясного сырья и готовых продуктов питания из них. Естественные и технические науки. 2018;1(115):21-26. / Vasiliev DA, Alyoshkin AV, Zolotukhin SN, Feoktistova NA, Martynova KB, Nasibullin IR, et al. The development of phage biological product against *Aeromonas hydrophila* for decontamination of fish, raw meat and ready-to-eat foods. *Natural and Technical Sciences*. 2018;1(115):21-26. (In Russian).
78. Алешкин АВ, Светоч ЭА, Воложанцев НВ, Киселева ИА, Рубальский ЕО, Ершова ОН, и др. Инновационные направления использования бактериофагов в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации. Бактериология. 2016;1(1):22-31. / Aleshkin AV, Svetoch EA, Volozantsev NV, Kiseleva IA, Rubalsky EO, Ershova ON, Novikova L.I. Innovative directions for using bacteriophages in the sphere of sanitary and epidemiological welfare of the Russian Federation. *Bacteriology*. 2016; 1(1): 22–31. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-22-31
79. Алешкин АВ, Ларина ЮВ, Воложанцев НВ, Зейгарник МВ, Киселёва ИА, Верёвкин ВВ, и др. Опыт деконтаминации пищевых полуфабрикатов с помощью бактериофагов. Вопросы диетологии. 2015;5(1):24-30. / Aleshkin AV, Larina YuV, Volozhantsev NV, Zeygarnik MV, Kiseleva IA, Verevkin VV, et al. An experience of decontamination of semi-processed foods using bacteriophages. *Vopr. dietol*. 2015;5(1):24-30. (Nutrition).
80. Алешкин АВ, Зулкарнеев ЭР, Киселева ИА, Емельяненко КА, Емельяненко АМ, Бойнович ЛБ. Опыт использования органо-неорганических гибридных покрытий с сорбированными бактериофагами для снижения риска развития STEC-инфекций. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2018;165(4):473-476. / Aleshkin AV, Zulkarneev ER, Kiseleva IA, Emelianenko CA, Emelyanenko AM, Boinovich LB. Experience in the use of organo-inorganic hybrid surfaces with sorbed bacteriophages to reduce the risk of developing STEC infections. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2018;165(4):473-476.
81. Lone A, Anany H, Hakeem M, Aguis L, Avdjian AC, Bouget M, et al. Development of prototypes of bioactive packaging materials based on immobilized bacteriophages for control of growth of bacterial pathogens in foods. *Int J Food Microbiol*. 2016 Jan 18;217:49-58. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.011
82. Cui H, Yuan L, Lin L. Novel chitosan film embedded with liposome-encapsulated phage for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7 in beef. *Carbohydr Polym*. 2017 Dec 1;177:156-164. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.08.137
83. Abaev I, Foster-Frey J, Korobova O, Shishkova N, Kiseleva N, Kopylov P, et al. Staphylococcal phage 2638A endolysin is lytic for *Staphylococcus aureus* and harbors an inter-lytic-domain secondary translational start site. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 Apr;97(8):3449-56. DOI: 10.1007/s00253-012-4252-4
84. Misiou O, van Nassau TJ, Lenz CA, Vogel RF. The preservation of *Listeria*-critical foods by a combination of endolysin and high hydrostatic pressure. *Int J Food Microbiol*. 2018 Feb 2;266:355-362. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.004
85. Ibarra-Sanchez LA, Van Tassell ML, Miller MJ. Antimicrobial behavior of phage endolysin PlyP100 and its synergy with nisin to control *Listeria monocytogenes* in Queso Fresco. *Food Microbiol*. 2018 Jun;72:128-134. DOI: 10.1016/j.fm.2017.11.013
86. Guo T, Xin Y, Zhang C, Ouyang X, Kong J. The potential of the endolysin Lysdb from *Lactobacillus delbrueckii* phage for combating *Staphylococcus aureus* during cheese manufacture from raw milk. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016 Apr;100(8):3545-54. DOI: 10.1007/s00253-015-7185-x
87. Kazanavičiūtė V, Misiūnas A, Gleba Y, Giritch A, Ražanskienė A. Plant-expressed bacteriophage lysins control pathogenic strains of *Clostridium perfringens*. *Sci Rep*. 2018 Jul 12;8(1):10589. DOI: 10.1038/s41598-018-28838-4

88. Perricone M, Arace E, Corbo MR, Sinigaglia M, Bevilacqua A. Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. *Front Microbiol.* 2015 Feb 9;6:76. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00076
89. Gomes MS, Cardoso MD, Guimarães AC, Guerreiro AC, Gago CM, Vilas Boas EV, et al. Effect of edible coatings with essential oils on the quality of red raspberries over shelf-life. *J Sci Food Agric.* 2017 Feb;97(3):929-938. DOI: 10.1002/jsfa.7817
90. Santos MIS, Martins SR, Verissimo CSC, Nunes MJC, Lima AIG, Ferreira RMSB, et al. Essential oils as antibacterial agents against food-borne pathogens: Are they really as useful as they are claimed to be? *J Food Sci Technol.* 2017 Dec;54(13):4344-4352. DOI: 10.1007/s13197-017-2905-0
91. Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential, and interactions with food components. *Food Microbiol.* 2009 Apr;26(2):142-50. DOI: 10.1016/j.fm.2008.10.00
92. Perricone M, Arace E, Corbo MR, Sinigaglia M, Bevilacqua A. Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. *Front Microbiol.* 2015 Feb 9;6:76. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00076.
93. Sharifi-Rad M, Varoni EM, Iriti M, Martorell M, Setzer WN, Del Mar Contreras M, et al. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytother Res.* 2018 Sep;32(9):1675-1687. DOI: 10.1002/ptr.6103.
94. Ramanathan S, Arunachalam K, Chandran S, Selvaraj R, Shunmugiah KP, Arumugam VR. Biofilm inhibitory efficiency of phytol in combination with cefotaxime against nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii*. *J Appl Microbiol.* 2018 Jul;125(1):56-71. DOI: 10.1111/jam.13741
95. Raimundo KF, Bortolucci WC, Glamočlija J, Soković M, Gonçalves JE, Linde GA, et al. Antifungal activity of *Gallesia integrifolia* fruit essential oil. *Braz J Microbiol.* 2018 Apr 12. pii: S1517-8382(17)31065-1. DOI: 10.1016/j.bjm.2018.03.006.
96. Alanazi S, Alnoman M, Banawas S, Saito R, Sarker MR. The inhibitory effects of essential oil constituents against germination, outgrowth and vegetative growth of spores of *Clostridium perfringens* type A in laboratory medium and chicken meat. *Food Microbiol.* 2018 Aug;73:311-318. DOI: 10.1016/j.fm.2018.02.003
97. Khatibi SA, Misaghi A, Moosavy MH, Akhondzadeh Basti A, Mohamadian S, Khanjari A. Effect of nanoliposomes containing *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on gene expression of Shiga toxin 2 in *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol.* 2018 Feb;124(2):389-397. DOI: 10.1111/jam.13641.
98. Araújo MK, Gumiela AM, Bordin K, Luciano FB, Macedo REF. Combination of garlic essential oil, allyl isothiocyanate, and nisin Z as bio-preservatives in fresh sausage. *Meat Sci.* 2018 Sep;143:177-183. DOI: 10.1016/j.meatsci.2018.05.002
99. Mohamed SH, Mohamed MSM, Khalil MS, Azmy M, Mabrouk MI. Combination of essential oil and ciprofloxacin to inhibit/eradicate biofilms in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Appl Microbiol.* 2018 Jul;125(1):84-95. DOI: 10.1111/jam.13755

Информация об авторе:

Ермоленко Зинаида Михайловна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0079

Information about author:

Zinaida M. Ermolenko, PhD (in Biology), junior researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0079

Новый тест для быстрой диагностики сепсиса

Исследователи разработали тест, который может быстро и надежно диагностировать сепсис, потенциально опасное для жизни осложнение бактериальных инфекций.

Быстрая диагностика сепсиса у госпитализированных пациентов имеет решающее значение, поскольку в тяжелых случаях среднее снижение выживаемости пациентов – 7,6% в час от начала низкого кровяного давления без эффективного противомикробного лечения. Ранняя идентификация патогена увеличивает вероятность правильного лечения и поможет избежать злоупотребления антибиотиками.

Описывается так называемая мультиплексная система обнаружения ПЦР в режиме реального времени на основе TaqMan, которая позволяет быстро обнаруживать 10 наиболее частых бактериальных патогенов из образцов крови.

Предполагается, что остаточные фрагменты ДНК бактерий могут быть обнаружены этой системой, даже если они были уничтожены антибактериальными препаратами или иммунной системой.

Liu C.-F, Shi X.-P, Chen Y, Jin Y, Zhang B.
Rapid diagnosis of sepsis with TaqMan-Based multiplex real-time PCR.

J Clin Lab Anal. 2018 Feb;32(2). DOI: 10.1002/jcla.22256



Легионеллез и его лабораторная диагностика

Б.В.Ерусланов, Э.А.Светоч, И.П.Мицевич

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

В обзоре кратко представлены таксономия и биология легионелл. Описаны факторы патогенности *Legionella pneumophila*, эпидемиология инфекции, клиническое течение легионеллезной пневмонии. Рассмотрены вопросы этиологической диагностики легионеллеза. Приведены схемы выявления и идентификации легионелл в клиническом материале и окружающей среде. Указывается на необходимость дальнейшего совершенствования диагностической базы легионеллеза в Российской Федерации.

Ключевые слова: легионеллез, *Legionella pneumophila*, таксономия, патогенез инфекции, экология легионелл, эпидемиология легионеллеза, клиническая картина, этиологическая лабораторная диагностика

Для цитирования: Ерусланов Б.В., Светоч Э.А., Мицевич И.П. Легионеллез и его лабораторная диагностика. Бактериология. 2018; 3(3): 58–67. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-58-67

Legionellosis and its laboratory diagnosis

B.V.Yerusanov, E.A.Svetoch, I.P.Mitsevich

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

The review presents taxonomy, biology, legionella. Pathogenicity factors, epidemiology of infection, clinical course of legionella pneumonia are presented. The questions of etiological diagnosis of infection, including methods of polymerase chain reaction for qualitative and quantitative identification of the causative agent of legionellosis, are considered. Schemes of identification and identification of legionella in clinical material and the environment are given. The need for further improvement of the diagnostic base of legionellosis in the Russian Federation is indicated.

Keywords: legionellosis, *Legionella pneumophila*, taxonomy, pathogenesis of infection, legionella ecology, epidemiology of legionellosis, clinic, etiological laboratory diagnostics

For citation: Yerusanov B.V., Svetoch E.A., Mitsevich I.P. Legionellosis and its laboratory diagnosis. Bacteriology. 2018; 3(3): 58–67. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-58-67

Заболевание, вызываемое различными видами бактерий семейства *Legionellaceae*, отмечается практически повсеместно. Свое название легионеллы получили после первой вспышки, зарегистрированной в 1976 г. в Филадельфии, когда во время конференции американского легиона у 221 участника развилась острая респираторная инфекция, для 34 человек оказалась летальной. Бактерии, выделенные из биоптатов легких умерших пациентов, получили название *Legionella pneumophila* [1].

Решающую роль в распространении легионеллеза играет техногенный фактор. Человек, сам того не подозревая, сформировал условия, при которых стало возможным накопление возбудителя в окружающей среде, увеличив тем самым риск попадания его в организм человека. Легио-

неллез (болезнь легионеров) – это пневмония, обусловленная главным образом *Legionella pneumophila*, в то время как лихорадка Понтиак является острым гриппоподобным заболеванием, вызываемым как *L. pneumophila*, так и другими видами легионелл. Болезнь сопровождается лихорадкой, интоксикацией, воспалением легких, поражением центральной нервной системы и органов пищеварения.

Таксономия

Семейство *Legionellaceae* представлено единственным родом *Legionella*, объединяющим к настоящему времени 70 видов. Некоторые виды легионелл характеризуются значительным антигенным разнообразием и включают до 16 серогрупп. В настоящее время общее количество

Для корреспонденции:

Ерусланов Борис Васильевич, 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
E-mail: erus47@yandex.ru

Статья поступила 03.08.2018 г., принята к печати 29.10.2018 г.

For correspondence:

Boris V. Yerusanov, leading researcher scientist of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0079
E-mail: erus47@yandex.ru

The article was received 03.08.2018, accepted for publication 29.10.2018

серогрупп в семействе *Legionellaceae* превысило 70, однако большинство видов представлено единственной серогруппой. Патогенными для человека считаются представители 39 серогрупп 20 видов легионелл (40% от общего количества описанных видов). Этиологическим агентом 90% легионеллезных инфекций у человека является *Legionella pneumophila*. Остальные 19 видов вызывают не более 10% заболеваний. Среди серогрупп вида *L. pneumophila* главная роль в заболевании человека принадлежит серогруппе 1. Кроме бактерий *L. pneumophila*, заболевание вызывают также *L. micdadei*, *L. longbeachae*, *L. dumoffii*, *L. bozemanii* и некоторые другие. Случаи обнаружения бактерий остальных видов у человека являются единичными, чаще всего их выявляют у пациентов с ВИЧ-инфекцией либо другими иммунодефицитными состояниями, в частности находящихся на иммуносупрессивной терапии после перенесенных трансплантаций органов [2–4].

Характеристика возбудителя

Легионеллы представляют собой мелкие граммотрицательные неспорообразующие слабокислотоустойчивые микроорганизмы длиной от 1 до 20 мкм. Для ряда видов показано наличие внешней полисахаридной капсулы. В мазках культур, выращенных на плотной питательной среде, подавляющее большинство легионелл имеет форму прямых или слегка изогнутых палочек. Легионеллы способны образовывать также нитевидные формы, иногда длиной от 8 до 200 мкм. Они образуют конгломераты, состоящие из множества клеток. Культуры легионелл, выделенные от больных людей, нередко отличаются выраженным полиморфизмом и интенсивным нитеобразованием. После 3–4-го пассажа на искусственных питательных средах вариабельность формы и размера у легионелл обычно уменьшается (рис. 1).

Жгутики у легионелл, выращенных на питательных средах, отсутствуют. Показано, что они могут образовываться в альвеолах больных людей. Помимо жгутиков, у многих легионелл на поверхности клеточной стенки обнаруживают пили. Как правило, они лучше всего видны у бактерий в период логарифмической фазы роста на питательных средах. Клеточная стенка легионелл, в отличие от других граммотрицательных бактерий, характеризуется значительным содержанием фосфолипидов, а 90% жирных кислот у легионелл составляют соединения с разветвленными боковыми цепями. Другим важным отличительным признаком легионелл является наличие у них убихинонов с боковыми цепями,

представленными 9–14 изопреновыми радикалами [5]. Соотношение жирных кислот и убихинонов, определяемое методом жидкостной хроматографии, является важным таксономическим признаком, позволяющим идентифицировать различные виды легионелл [2]. Однако специфичность этого метода может быть недостаточной вследствие значительной химической вариабельности соотношения жирных кислот и убихинонов в пределах одного и того же вида легионелл. В настоящее время хроматографический анализ заменяется более специфичными молекулярно-генетическими методами. Большинство видов легионелл характеризуется сходными биохимическими и культуральными свойствами. В-лактамаза продуцируется всеми известными видами, за исключением *L. micdadei* и *L. feeleii*. Гидролиз гиппурата характерен для всех серогрупп вида *L. pneumophila*, за исключением серогрупп 4 и 15, а также для вида *L. feeleii*. Практически все штаммы легионелл разжижают желатин [6] (таблица). В противоположность многим бактериям, сбраживающим углеводы, легионеллы в качестве источника энергии и питательных веществ используют аминокислоты. L-цистеин является обязательным компонентом питательных сред для выращивания легионелл. Важными факторами роста легионелл являются также аминокислоты аргинин, изолейцин, лейцин, метионин и ионы железа. В связи с этим в состав селективных питательных сред для легионелл включают дрожжевой экстракт и пиррофосфат железа.

По чувствительности к химическим и физическим факторам легионеллы не отличаются от большинства неспоровых форм бактерий. При действии 1% формалина, 70% этилового спирта, 0,002% фенола клетки *L. pneumophila* погибают в течение минуты. Легионеллы сохраняют жизнеспособность более 10 лет в полужидком агаре при –70°C. При комнатной температуре легионеллы в дистиллированной и водопроводной воде сохраняются в течение нескольких недель [7].

Факторы патогенности легионелл

L. pneumophila размножаются в альвеолярных макрофагах, полиморфноядерных нейтрофилах и моноцитах крови человека. При аспирации человеком аэрозоля с легионеллами возбудитель захватывается альвеолярными макрофагами и размножается в них. Результатом размножения легионелл является разрушение фагоцитирующих клеток и выход легионелл в легочную ткань, что в конечном итоге приводит к развитию воспалительного процесса, характерного для легионеллеза [8].

Признак	<i>L. pneumophila</i>	<i>L. bozemanii</i>	<i>L. dumoffii</i>	<i>L. micdadei</i>	<i>L. feeleii</i>	<i>L. longbeachae</i>
Рост на угольно-дрожжевом агаре с L-цистеином и пиррофосфатом железа	+	+	+	+	+	+
Рост на угольно-дрожжевом агаре без L-цистеина и пиррофосфата железа	–	–	–	–	–	–
Каталаза	+	+	+	+	+	+
Восстановление нитратов	–	–	–	–	–	–
Ферментация углеводов	–	–	–	–	–	–
Гидролиз гиппурата натрия	+	–	–	–	–	–
Желатиназная активность	+	+	+	+	+	+
β-Лактамазная активность	+	+	+	+	+	+
Оксидаза	Вариабельный					
Аутофлюоресценция		+	+	+	+	+

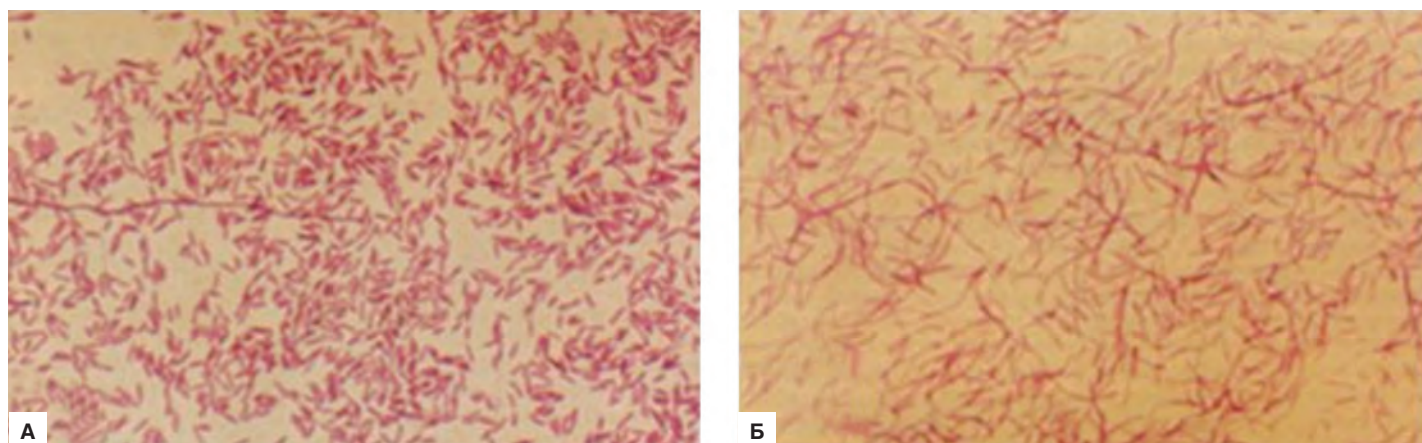


Рис. 1. Микроскопическая картина клеток *L. pneumophila* после многократного культивирования на плотной питательной среде (А), выделенных из секционного материала (Б). Окраска по Граму. $\times 1150$

У возбудителя легионеллеза описаны следующие факторы патогенности. Факторы адгезии – структуры клеточной стенки легионелл, обеспечивающие прикрепление патогена к фагоцитам. К ним относится белок *tip* с молекулярной массой 24 кДа, который участвует не только в адгезии легионелл к макрофагам, но и в проникновении их в фагоциты. Показана роль белка *tip* в экспрессии факторов патогенности легионелл при контакте их с макрофагами и простейшими. К адгезинам относится белок внешней мембраны с молекулярной массой 29 кДа – видоспецифический порин, функция этого порина состоит в связывании С3-компонента комплемента. В адгезии легионелл к альвеолярным макрофагам участвует и родоспецифический антиген цитоплазматической мембраны [9, 10].

К ферментам патогенности относят Zn-металлопротеазу (цитолизин) – белок с молекулярной массой 38 кДа. Белок является протеазой и нарушает функцию фагоцитоза. Фосфолипаза С легионелл с молекулярной массой 50–54 кДа участвует в гидролизе фосфатидилхолина и нейтрализует нейтрофилы [8]. К ферментам патогенности относят также легиолизин, вызывающий гемолиз эритроцитов и инактивирующий каталазу. Принимают участие в пато-

генезе болезни и другие ферменты: фосфатазы, липазы, нуклеазы.

Токсины, продуцируемые *L. pneumophila*: термостабильный пептид, который нарушает процесс фагоцитоза макрофагами; термолабильный пептид, который ингибирует «кислородный взрыв» в макрофагах и участвует в развитии легочных поражений; эндотоксин (ЛПС), вызывающий лихорадку, гипогликемию, нарушение кровоснабжения органов и ацидоз.

Различают следующие этапы взаимодействия легионелл с фагоцитами: 1) фагоцитоз и интернализация; 2) формирование и функционирование фагосом легионелл; 3) образование «репликативной вакуоли»; 4) заключительная стадия фагоцитоза и гибель фагоцитирующей клетки. Процессы, происходящие при фагоцитозе: ингибирование «кислородного взрыва», защелачивание фагосомальной среды, торможение движения клеточных органелл. Таким образом, легионелла преобразует фагосому в нишу для собственной репликации [3, 11]. На рисунке 2 представлены этапы взаимодействия 4 легионелл с макрофагом, в процессе которого происходит реализация патогенного потенциала легионелл.

Геном легионелл

Важнейшими свойствами генома *L. pneumophila* являются его высокая пластичность, относительно небольшое содержание гуанина и цитозина, а также большое количество уникальных генов, характерных только для рода *Legionella*. Наиболее многочисленная категория таких генов отвечает за метаболизм, прежде всего за энергетический обмен, обмен аминокислот, липидов и углеводов. В геноме легионелл представлены в основном гены, контролирующие системы аэробного клеточного дыхания. Гены, контролирующие циклы анаэробного дыхания, отсутствуют. Генетические детерминанты системы катаболизма олигопептидов и аминокислот представлены значительно шире, чем гены цикла расщепления углеводов, что связано с преимущественным питанием легионелл белковыми субстратами. Внутриклеточный паразитический образ жизни легионелл определяет их незначительную потребность в системах внутренней регуляции, что выражается в небольшом количестве регуляторных генов [3, 12]. Важным в геноме легионелл является комплекс генов,

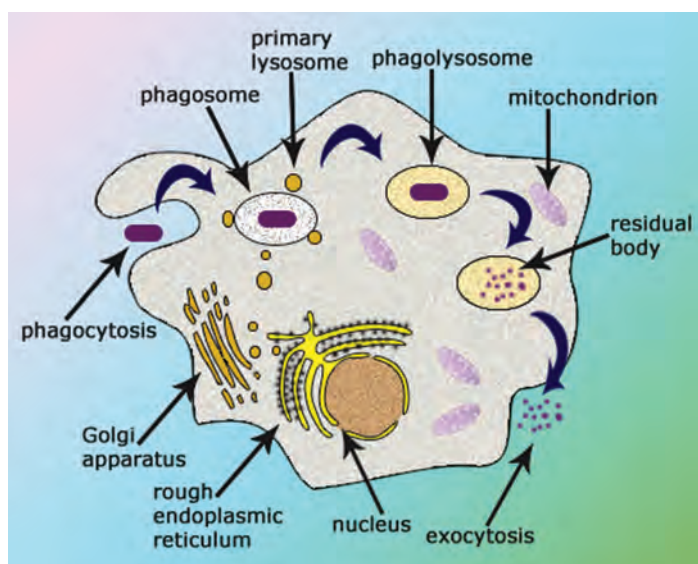


Рис. 2. Взаимодействие легионелл с фагоцитом [13].

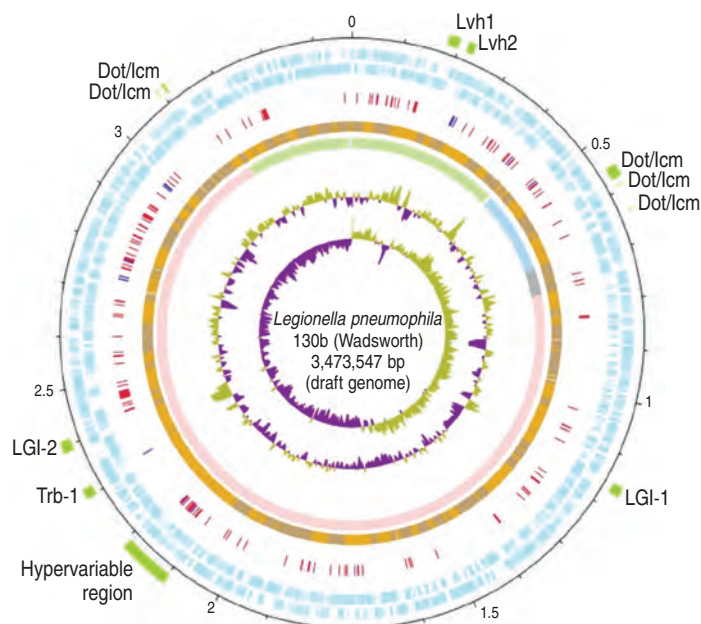


Рис. 3. Гены *L. pneumophila*, используемые при молекулярно-генетическом типировании.

кодирующих систему секреции IV типа (*Dot/Icm*). Эта система является одним из важнейших факторов вирулентности *L. pneumophila*, участвующих в патогенезе заболевания. Основная роль данной системы – предотвращение слияния фагосомы с лизосомами и формирование репликационной вакуоли, создающей среду для успешного размножения легионелл. *Dot/Icm* система *L. pneumophila* является крупным белковым комплексом, который кодируется 24 генами группы *Dot/Icm*. Легионеллы продуцируют и доставляют в макрофаги посредством данной системы секреции около 300 эффекторных белков. Системы, регулирующие отношения хозяина и патогена, надежны, мутации, инактивирующие какой-либо белок, быстро компенсируются функцией других генов. На рисунке 3 представлена карта генома легионелл, на которой показано расположе-

ние генов системы *Dot/Icm* и других диагностически значимых генов [13].

Патогенез

Легионеллы в процессе аспирации попадают в альвеолы и бронхиолы, где они захватываются макрофагами, размножаются и вызывают гибель инфицированных макрофагов. Активное размножение легионелл ведет к увеличению концентрации токсинов и других вредных продуктов жизнедеятельности возбудителя. В результате этого развиваются интоксикация организма и пневмония. В воспалительных процессах участвуют инфицированные альвеолярные макрофаги, выделяющие цитокины, которые поражают паренхиму легких, межальвеолярные пространства. Бронхи не поражаются. Образуются воспалительные конгломераты, содержащие нейтрофилы, макрофаги, фибрин. Очаговая пневмония захватывает нижние доли легкого, что приводит к интерстициальным изменениям. Конгломераты некротизируются, образуя абсцессы легкого, мокрота приобретает гнойный характер. Следующий этап – бактериемия, при которой движение легионелл с током крови по различным органам и системам приводит к нарушению микроциркуляции, поражению клеток, гидролизу иммуноглобулинов, развитию геморрагических процессов, поражаются почки, легкие, печень, костный мозг, иногда может развиваться септический тип легионеллеза (эндокардит, перикардит) [13]. Высвобождающийся после разрушения легионелл эндотоксин индуцирует токсическую энцефалопатию и инфекционно-токсический шок. Токсины легионелл поражают эпителиальные клетки почечных канальцев, что ведет к развитию острой почечной недостаточности [1].

Особенности экологии легионелл

L. pneumophila – обитатель пресноводных водоемов. Концентрация легионелл в природных водных экосистемах крайне низка и не превышает 10^3 КОЕ/л. Очевидно, что при такой концентрации легионелл в водоемах возможность заражения человека легионеллами маловероятна. Для



Рис. 4. Механизм образования биопленок [32].

легионелл, как и для многих других водных или почвенных микроорганизмов, естественным является некультивируемое состояние. Некультивируемые формы легионелл обнаруживали с помощью иммунофлюоресцентного анализа в воде рек и озер [14]. Легионеллам присуща способность к симбиотическому существованию с сине-зелеными водорослями и с простейшими. Экспериментально показано, что сине-зеленые водоросли индуцируют размножение легионелл за счет продуктов своего метаболизма, которые являются источником энергии для *L. pneumophila*. Причиной активного размножения сине-зеленых водорослей в воде естественных водоемов является загрязнение окружающей среды. В этих условиях взаимодействие легионелл с сине-зелеными водорослями вполне может стать одной из причин увеличения количества патогена в воде и представлять потенциальные риски для человека. Легионеллы могут паразитировать в организме простейших (амебах), которые широко распространены в воде и почве. В одной амёбной клетке может содержаться до 1000 клеток *L. pneumophila*. Амебы, инфицированные легионеллами, – еще один путь аэрозольного заражения человека легионеллезом. Амебы часто выделяются из систем кондиционирования, из систем горячего и холодного водоснабжения, из теплых вод электростанций. Попадая в аэрозоль, амебы, содержащие *L. pneumophila*, препятствуют разрушению возбудителя. Таким образом, для *L. pneumophila* возможны две экологические ниши. Первая – естественные водоемы с широким диапазоном факторов, необходимых для существования легионелл, и вторая – это вода в системах, искусственно созданных человеком.

Существенным фактором выживания легионелл в среде обитания является способность к формированию биопленок. Биопленки, формируемые микроорганизмами, широко представлены в природных водоемах, в искусственных водных системах, их обнаруживают на внутренних поверхностях труб систем водоснабжения, фильтрации и очистки воды, в системах кондиционирования воздуха. Биопленка – это экологическая ниша, благоприятная для размножения легионелл в неблагоприятных условиях окружающей среды. Показано, что в биопленках происходит обмен химическими сигналами между легионеллами одного вида и между гетерологичными видами. Клетки легионелл в составе биопленок отличаются от «свободно плавающих клеток», а также от клеток, выращенных на плотных питательных средах повышенной устойчивостью к антибиотикам, дезинфицирующим веществам и другим вредным факторам. Биопленки из легионелл часто формируются в резиновых и пластмассовых дренажных трубках, а также в системах водоснабжения. Показано, что застой теплой воды способствует формированию биопленки, на основании чего рекомендуется промывка водопроводной системы горячей водой (с температурой более 60°C), а также ликвидация всех слепых участков трубопроводов [15, 16]. При изучении биопленок, образованных легионеллами, особое место принадлежит методам электронной микроскопии, которые позволяют изучить структурные особенности биопленок и оценить влияние различных факторов внешнего воздействия на динамику их образования (рис. 4). Анализ особенностей формирования биопленок легионелл на по-

верхности различного оборудования необходим для создания препаратов, разрушающих биопленки или предотвращающих их образование.

Эпидемиология

Вероятность заражения человека возбудителями легионеллеза возникает при колонизации ими искусственных водных систем, к которым относят: 1) системы горячего и холодного водоснабжения; 2) устройства кондиционирования воздуха; 3) градирни; 4) системы, связанные с циркуляцией воды (джакузи); 5) естественные бассейны и термальные источники. Наиболее распространенный путь заражения – вдыхание человеком аэрозолей, загрязненных легионеллами. Вероятность заражения легионеллезом определяют по уровню контаминации воды патогеном, эффективности образования аэрозолей, содержащих бактерии, скорости распространения аэрозоля, а также состоянию иммунной системы человека. Все крупные эпидемические вспышки и спорадические случаи легионеллеза возникают при распространении мелкодисперсного аэрозоля, загрязненного легионеллами (диаметр частиц <5 мкм), генерируемого различными искусственными водными системами. Аспирация загрязненной легионеллами воды является вторым важным путем инфицирования человека. Заражаются подобным образом, как правило, лица с иммунодефицитом на фоне тяжелых сопутствующих заболеваний и иммуносупрессивной терапии. Аспирация легионелл с водой может вызывать как спорадические, так и вспышечные случаи легионеллеза.

Заражение человека легионеллами происходит следующим образом. После контакта с инфекционным агентом легионеллезная пневмония (болезнь легионеров) развивается у 5–10% лиц, а лихорадка Понтиак – у 80–100% людей. Заражение легионеллезом человека от человека, больного этой инфекцией, практически невозможно, поскольку на внешней мембране легионелл отсутствуют специфические адгезины к эпителиальным клеткам слизистой оболочки верхних дыхательных путей. Данные о носительстве и длительности персистенции легионелл в организме человека отсутствуют [9, 17].

По характеру приобретения легионеллезной инфекции различают три типа заболеваний: внебольничный легионеллез (болезнь легионеров), нозокомиальный легионеллез и «легионеллез путешественников». Болезнь легионеров в 2–3 раза чаще поражает мужчин, чем женщин; у детей инфекцию диагностируют крайне редко. Наиболее подвержены заболеванию легионеллезом люди в возрасте от 50 до 70 лет. Факторами риска заражения легионеллезом являются курение, злоупотребление алкоголем, диабет и тяжелые хронические патологии. Однако болезнь легионеров, включая тяжелые формы, может возникнуть у совершенно здоровых людей, поэтому отсутствие основного фонового заболевания не должно служить причиной исключения легионеллеза из спектра возможных диагнозов. Вспышки легионеллеза обычно наблюдают в летние и осенние месяцы. Примером типичного внебольничного легионеллеза является эпидемическая вспышка болезни легионеров в г. Верхняя Пышма Свердловской области [18].

Нозокомиальный (внутрибольничный) легионеллез чаще регистрируется в виде спорадических случаев, но нередко

бывают и вспышечные случаи. При этом риск возникновения нозокомиального легионеллеза связан не только с контаминацией легионеллами систем водоснабжения, кондиционирования и оборудования медицинского учреждения, но и с наличием восприимчивых к инфекции лиц со сниженным иммунитетом. Факторами риска при нозокомиальном легионеллезе являются оперативное вмешательство, интубационный наркоз, подключение пациента к аппарату искусственного дыхания и возможная аспирация контаминированной воды. Наиболее предрасположены к инфекции лица, получающие иммуносупрессивную терапию, и больные, принимающие кортикостероиды. Помимо систем водоснабжения, причиной внутрибольничного легионеллеза может быть контаминированный медицинский инструмент (стоматологические установки). При нозокомиальном легионеллезе, в отличие от внебольничного, снижается заражающая доза возбудителя – для возникновения инфекции достаточно нескольких клеток легионелл. Установлено, что, помимо *L. pneumophila*, внутрибольничную инфекцию часто вызывают другие виды легионелл: *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. longbeachae* [19, 20].

«Легионеллез путешественников». В большинстве стран 50% всех регистрируемых случаев легионеллеза связаны с путешествиями. Во время путешествия люди чаще всего заражаются в гостиницах, других общественных учреждениях, на крупных судах и т.д. Случается «легионеллез путешественников» в виде спорадических и вспышечных случаев, нередко болезнь заканчивается летально.

Легионеллезная инфекция – вторая по частоте причина развития тяжелых пневмоний после пневмококковой инфекции. В индустриально развитых странах в 2–16% случаев причиной внебольничной пневмонии является легионеллезная инфекция. В США ежегодно диагностируют 8000–18 000 случаев легионеллеза.

Клиническая картина

Инкубационный период при легионеллезе длится от 2 до 10 дней, однако на фоне иммунологических нарушений он может затянуться до 3 нед. Заболевание начинается внезапно, с резкого повышения температуры тела, сопровождающегося ознобом, профузной потливостью, головной болью и миалгией. Возникающий кашель может быть незначительным и сухим, возможно появление скудной гнойной мокроты. Боль в груди плевритного характера является основной жалобой у пациентов, что указывает на эмболию в системе мелких ветвей легочной артерии. Одышка, возникающая в силу распространения поражения легких и вовлечения в патологический процесс плевры, появляется уже в первые сутки заболевания и при неадекватном лечении, как правило, прогрессирует [21, 22]. Спутанность сознания – наиболее часто встречаемый симптом со стороны нервной системы, однако возможен широкий спектр неврологических изменений от головной боли до энцефалопатии. При физикальном обследовании у большинства больных прослушиваются хрипы в легких; бронхиальное дыхание диагностируют более чем у 20% больных. У 17% пациентов возможна артериальная гипотензия. У всех больных болезнью легионеров к 3-му дню заболевания на рентгенограмме грудной клетки видны патологические изменения, которые имеют очаговый

характер. В большинстве случаев через 3–6 дней после появления первых симптомов тяжесть заболевания усугубляется, в связи с чем требуется немедленная госпитализация. При легионеллезе могут развиваться осложнения со стороны сердечно-сосудистой системы, почек, нервной и мышечной систем. Причиной их возникновения может быть распространение инфекции лимфатическим и гематогенным путями из легких к другим органам. В целом несмотря на то что период реабилитации после перенесенной инфекции может занять несколько месяцев, большинство пациентов полностью выздоравливают без клинических последствий [5, 20].

Лихорадка Понтиак – острое гриппоподобное заболевание, не сопровождающееся поражением легочной ткани. Инкубационный период при лихорадке короткий и составляет не более 36 ч. При контакте с легионеллами обычно поражаются более 90% совершенно здоровых людей. Основными симптомами болезни являются недомогание, миалгии, подъем температуры до 39°C, озноб, головные боли. На рентгенограмме органов грудной клетки патологических изменений не обнаруживают. Осложнения и летальные исходы зафиксированы не были [9].

Инкубационный период лихорадки Форт–Брагг длится до 10 сут. Основные клинические симптомы: лихорадка до 38–38,5°C, озноб, головная боль, полиморфная сыпь на коже. Шелушение не наблюдается. Длительность болезни – 3–7 дней. Течение благоприятное [29].

Этиотропная терапия

Инфицирование легионеллами людей с нормальным иммунным статусом приводит к заболеваниям легкой и средней тяжести, которые успешно могут лечиться амбулаторно препаратами из групп макролидов, фторхинолонов, тетрациклинов или сульфаниламидов. Однако предпочтения отдают макролидам: эритромицину, кларитромицину, азитромицину, рокситромицину. Для достижения максимального бактерицидного эффекта и профилактики рецидивов заболевания в качестве препаратов первого выбора рекомендуются азитромицин и фторхинолоны нового поколения. Одним из преимуществ данных препаратов является их слабая токсичность при комбинации с другими препаратами, что особенно важно в лечении больных с иммунодефицитом. В случае неосложненной пневмонии возможно пероральное назначение антибактериальных препаратов, но поскольку на фоне болезни легионеров часто случаются нарушения со стороны пищеварительного тракта, всасывание антибиотика может быть нарушено. В связи с этим при тяжелой пневмонии предпочтительнее парентеральный путь введения препаратов [24, 25].

Иммунитет

У лабораторных животных, зараженных легионеллами, развивается как гуморальный, так и клеточный иммунитет. Несомненным подтверждением наличия гуморального звена иммунных реакций у человека является сероконверсия, учитываемая в диагностике легионеллеза. Тем не менее остается неизвестным, играют ли специфические сывороточные антитела существенную роль в защите организма от *L. pneumophila*. Показано, что опсонизация клеток возбудителя



Рис. 5. Рост *L. pneumophila* на среде ЛЕГИОНЕЛБАКАГАР.

специфическими антителами стимулирует их фагоцитоз, однако практически не угнетает внутриклеточную пролиферацию легионелл в фагосомах. При легионеллезе развитие иммунных реакций происходит по типу гиперчувствительности замедленного типа, то есть с преимущественным вовлечением клеточного иммунитета. В экспериментальных моделях на мышах, у которых отсутствовала одна или обе субпопуляции CD4⁺- и CD8⁺- клеток, установлено, что отсутствие любого из типов этих лимфоцитов замедляет элиминацию легионелл из легких животных, при этом самое тяжелое течение инфекции и высокая к ней восприимчивость зарегистрированы у мышей с полным отсутствием обеих субпопуляций клеток. К числу антигенов легионелл, индуцирующих клеточный иммунный ответ, относятся белки внешней клеточной мембраны, а также основные секреторные протеазы [10, 17].

Этиологическая лабораторная диагностика

Для диагностики клинического легионеллеза используют следующие методы [1, 5, 19, 21, 26, 27]:

- бактериологическое исследование клинических образцов на наличие легионелл – «золотой стандарт»;

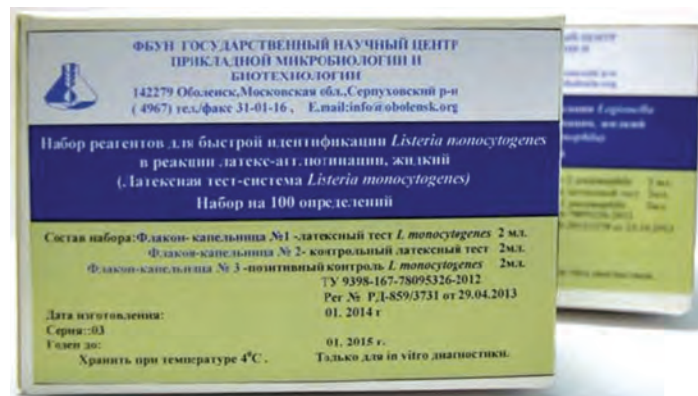


Рис. 6. Набор для идентификации легионелл в реакции латекс-агглютинации.

- выявление специфических антител к бактериям рода *Legionella* в сыворотке крови пациентов;
- обнаружение растворимого полисахаридного антигена легионелл в моче;
- определение ДНК легионелл с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР РВ).

Диагноз «легионеллез» считается установленным в случае клинически и рентгенологически подтвержденной у больного острой пневмонии нижних дыхательных путей плюс следующие критерии:

- а) выделение культуры легионелл из мокроты и других секретов дыхательных путей, ткани легкого или крови;
- б) четырехкратное или большее нарастание в сыворотке крови титра антител к *L. pneumophila* серогруппы 1;
- в) обнаружение специфического полисахаридного антигена в моче с помощью иммунохроматографического диагностического теста;
- г) обнаружение ДНК легионелл путем применения ПЦР РВ.

Диагноз «легионеллез» считается предположительно установленным в случае клинически и рентгенологически подтвержденной у больного острой пневмонии нижних дыхательных путей и соответствия следующим критериям:

- а) четырехкратное или большее нарастание титра антител сыворотки крови к *L. pneumophila* 2–16 серогрупп или другим видам легионелл;
- б) обнаружение высокого титра антител в одиночной сыворотке ($\geq 1:256$) к *L. pneumophila* 1–16 серогрупп, а также другим видам легионелл;
- в) обнаружение специфического антигена или легионелл в респираторных секретах или ткани легких путем прямого иммунофлюоресцентного окрашивания с использованием разрешенных к применению моноклональных антител;
- г) обнаружение ДНК легионелл путем применения ПЦР РВ.

В качестве клинических образцов для исследования на присутствие легионелл используют в основном мокроту, биоптаты легких, бронхоальвеолярные смывы, лаваж, аспираты и кровь. Общим правилом бактериологических исследований является взятие материала для исследования до начала антибактериальной терапии. Для выделения и культивирования легионелл используют питательную среду ЛЕГИОНЕЛБАКАГАР производства ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболensk, Россия). Все компоненты этой среды, кроме L-цистеина и антибиотиков, растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 980 мл. Добавляют к раствору циклогексимид и глицин, перемешивают и автоклавируют 10 мин при температуре 110°C. После охлаждения до температуры 46°C добавляют растворы ванкомицина, полимиксина-М сульфата и L-цистеина, пропущенные через фильтр (0,22 мкм). Все компоненты перемешивают и среду быстро разливают в чашки. Хранят среду в металлических контейнерах в холодильнике не более 2 нед. Чашки с посевами инкубируют при температуре 35°C в течение 5 сут (рис. 5). Для выделения легионелл применяют и импортные среды: угольно-дрожжевой агар, В.М.Р.А агар (Oxoid, Англия). При подозрении на *Legionella* spp. выросшие колонии пересевают на среду ЛЕГИОНЕЛБАКАГАР с цистеином и на контрольную среду ЛЕГИОНЕЛБАКАГАР без цистеина. Рост на среде ЛЕГИОНЕЛБАКАГАР и отсутствие роста на контрольной среде является показателем

выделения культуры рода *Legionella* spp. Одним из наиболее быстрых, надежных и специфических методов идентификации выросших колоний легионелл является реакция латекс-агглютинации. Для определения *L. pneumophila* серогруппы 1 хорошо зарекомендовал себя набор для латекс-агглютинации производства ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск, Россия) (рис. 6). Для идентификации *L. pneumophila* серогрупп 2–14 используют набор фирмы Oxoid (Англия). Этих двух тест-систем вполне достаточно для практической лабораторной диагностики легионеллеза. Для обнаружения растворимого специфического полисахаридного антигена *L. pneumophila*, выделяющегося с первого дня заболевания с мочой, используют хроматографический метод, одними из важных преимуществ которого являются его высокая специфичность (100%) и быстрота постановки. Чувствительность метода при исследовании различных панелей исследуемых образцов мочи колебалась от 56 до 99%, при этом наибольшая чувствительность была отмечена при тестировании образцов мочи, полученных от больных с бактериологически подтвержденной легионеллезной пневмонией, вызванной *L. pneumophila* серогруппы 1. Чувствительность метода значительно понижалась при диагностике легионеллеза, вызванного другими серогруппами *L. pneumophila* и другими видами легионелл, и составляла от 14 до 69% [10, 16, 17, 23].

Молекулярно-генетические методы диагностики легионеллеза основаны на постановке полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР РВ). Наиболее специфическими участками генома для идентификации *Legionella* spp., а также дифференциации видов в пределах рода *Legionella* являются гены *5S*, *16S* и *23S* РНК, а также гены *mip*. При анализе мокроты либо бронхоальвеолярных смывов чувствительность и специфичность ПЦР РВ достигает 100%. Успешные результаты получаются при использовании ПЦР РВ для выявления легионелл в пробах воды из систем водоснабжения, очистки и охлаждения. Особый интерес вызывает разработка количественных тест-систем на основе ПЦР в реальном времени, позволяющих оценить степень контаминации источников воды легионеллами. К настоящему времени разработаны методы, дающие возможность обнаруживать не более 60 геномных копий *L. pneumophila* в 1 л воды.

Выделение и идентификацию легионелл в образцах воды проводят, используя следующие методы [17, 28]:

- бактериологический анализ;
- обнаружение ДНК *L. pneumophila* в воде (качественное и количественное) с помощью набора АмплиСенс® *Legionella pneumophila*-FL (Интерлабсервис, Москва, Россия) для постановки ПЦР-РВ.

В настоящее время для внутривидовой характеристики штаммов *L. pneumophila*, выделенных из внешней среды и клинического материала, используют мультилокусное секвенирование (MLST) [6, 12, 29]. Для *L. pneumophila* протокол MLST был разработан в 2005 г. исследователями ряда стран, входящих в Европейскую рабочую группу по легионеллезу (EWGL), и активно используется практически всеми европейскими и другими странами, участвующими в программах EWGLI (с 2010 года ELDSNet). В России активно используют протокол SBT для характеристики штаммов ле-

гионелл, выделяемых при вспышках и спорадических случаях легионеллеза, а также в целях мониторинга потенциально опасных водных объектов.

Таким образом, анализ современной литературы, посвященной легионеллезной инфекции, свидетельствует о наличии в Российской Федерации современной диагностической базы для проведения систематического мониторинга легионелл в потенциально опасных для человека водных объектах, а также для своевременной постановки диагноза на легионеллез и идентификации его возбудителей. Тем не менее необходимы дальнейшие исследования по совершенствованию диагностики легионеллеза в нашей стране, в частности по созданию латексных тест-систем для идентификации бактерии рода *Legionella* и легионелл 2–16 серогрупп *L. pneumophila*. Актуальными остаются также исследования по изучению генетического разнообразия культур *L. pneumophila*, выделяемых в нашей стране от больных и объектов внешней среды. ФБУН ГНЦ ПМБ является референс-центром по легионеллезной инфекции в Роспотребнадзоре. Наши специалисты будут благодарны всем коллегам из региональных Центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, которые сочтут возможным и полезным сотрудничать с нами по вопросам мониторинга легионелл в потенциально опасных для человека водных системах, диагностики легионеллеза и идентификации его возбудителей.

Литература

1. Тартаковский ИС, Адгамов РР, Ермолаева СА, Дронина ЮЕ, Карпова ТИ, Галстян ГМ, и др. Методические особенности диагностики легионеллезной пневмонии в лечебно-профилактических учреждениях. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2013;15(3):166-72.
2. Тартаковский ИС, Груздева ОА, Галстян ГМ, Карпова ТИ. Профилактика, диагностика и лечение легионеллеза. М., 2013.
3. Теменчикова НД, Тартаковский ИС. Легионеллезная инфекция. М.: Медицина; 2007.
4. Degtyar E, Zusman T, Ehrlich M, Segal G. A Legionella effector acquired from protozoa is involved in sphingolipids metabolism and is targeted to the host cell mitochondria. Cell Microbiol. 2009 Aug;11(8):1219-35. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01328.x
5. Тартаковский ИС. Диагностика и профилактика легионеллеза. Поликлиника. 2015;6:40-3.
6. Eisenreich W, Heuner K. The life stage-specific pathometabolism of *Legionella pneumophila*. FEBS Lett. 2016 Nov;590(21):3868-3886. DOI: 10.1002/1873-3468.12326.
7. Онищенко ГГ, Демина ЮВ, Тартаковский ИС. Современная концепция организации эпидемиологического надзора за легионеллезной инфекцией. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2009;5:85-91.
8. Shin S, Roy CR. Host cell processes that influence the intracellular survival of *Legionella pneumophila*. Cell Microbiol. 2008 Jun;10(6):1209-20. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2008.01145.x
9. Correia AM, Ferreira JS, Borges V, Nunes A, Gomes B, Capucho R, et al. Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires' Disease. N Engl J Med. 2016 Feb 4;374(5):497-8. DOI: 10.1056/NEJMc1505356.
10. European Center for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease - Annual Epidemiological Report for 2015. ECDC; Stockholm, 2015.
11. Gomez-Valero L, Rusniok C, Buchrieser C. *Legionella pneumophila*: population genetics, phylogeny and genomics. Infect Genet Evol. 2009 Sep;9(5):727-39. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.05.004

12. Potočnjak M, Magdalenić Z, Dijan M, Rebić D, Gobin I. Environmental factors affecting the survival of soil dwelling *Legionella longbeachae* in water. *Ann Agric Environ Med.* 2016 Sep;23(3):452-5. DOI: 10.5604/12321966.1219186.
13. Schroeder GN, Petty NK, Mousnier A, Harding CR, Vogrin AJ, Wee B, et al. *Legionella pneumophila* Strain 130b Possesses a Unique Combination of Type IV Secretion Systems and Novel Dot/Icm Secretion System Effector Proteins. *J Bacteriol.* 2010 Nov;192(22):6001-16. DOI: 10.1128/JB.00778-10
14. Онищенко ГГ, Покровский ВИ, Тартаковский ИС, Малеев ВВ, Лазикова ГФ., Чистякова ГГ, Демина ЮВ, Карпова ТИ. Современные взгляды на эпидемиологию легионеллеза: алгоритм действия. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2008;2:1-10.
15. Садретдинова ОВ, Груздева ОА, Карпова ТИ. Контаминация *Legionella pneumophila* систем горячего водоснабжения зданий общественного назначения, в том числе лечебно-профилактических учреждений. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2011;13(2):163-7.
16. Kozak NA, Buss M, Lucas CE, Frace M, Govil D, Travis T, et al. Virulence factors encoded by *Legionella longbeachae* identified on the basis of the genome sequence analysis of clinical isolate D-4968. *J Bacteriol.* 2010 Feb;192(4):1030-44. DOI: 10.1128/JB.01272-09
17. Mascarenhas DP, Zamboni DS. Inflammasome biology taught by *Legionella pneumophila*. *J Leukoc Biol.* 2017 Apr;101(4):841-849. DOI: 10.1189/jlb.3MR0916-380R
18. Тартаковский ИС, Гинцбург АЛ, Лазикова ГФ, Чистякова ГГ, Демина ЮВ, Карпова ТИ, и др. Стандарты лабораторной диагностики легионеллеза и их применение во время эпидемической вспышки пневмоний в г. Верхняя Пышма. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2008;2:16-9.
19. Тартаковский ИС, Галстян ГМ, Карпова ТИ, и др. Методические особенности диагностики легионеллезной пневмонии в лечебно-профилактических учреждениях. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2012;14(2):100-6.
20. Онищенко ГГ, Лазикова ГФ, Чистякова ГГ, Демина ЮВ, Никонов БИ, Романенко ВВ, и др. Эпидемиологическая характеристика вспышки легионеллеза в г. Верхняя Пышма. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2008;2:82-5.
21. Тартаковский ИС, Синопальников АИ, Демина ЮВ, Груздева ОА. Профилактика легионеллеза как основа нового направления профилактики нозокомальных инфекций. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2010;4:272-83.
22. Fitzhenry R, Weiss D, Cimini D, Balter S, Boyd C, Alleyne L, et al. Legionnaires' Disease Outbreaks and Cooling Towers, New York City, New York, USA. *Emerg Infect Dis.* 2017 Nov;23(11). DOI: 10.3201/eid2311.161584.
23. Marchello C, Dale AP, Thai TN, Han DS, Ebell MH. Prevalence of Atypical Pathogens in Patients With Cough and Community-Acquired Pneumonia: A Meta-Analysis. *Ann Fam Med.* 2016 Nov;14(6):552-566. DOI: 10.1370/afm.1993.
24. Груздева ОА, Тартаковский ИС. Актуальные вопросы эпидемиологии и лабораторной диагностики легионеллеза, связанного с оказанием медицинской помощи. *Медицинский альманах.* 2015;5(40):44-7.
25. Rucinski SL, Murphy MP, Kies KD, Cunningham SA, Schuetz AN, Patel R. Eight Years of Clinical Legionella PCR Testing Illustrates a Seasonal Pattern. *J Infect Dis.* 2018 Jul 13;218(4):669-670. DOI: 10.1093/infdis/jiy201
26. Карпова ТИ, Тартаковский ИС. Особенности эпидемиологии и лабораторной диагностики легионеллеза. *Инфекционные болезни. Новости. Мнения. Обучение.* 2015;4(13):51-8.
27. Яцышина СБ, Карпова ТИ, Мариненко ОВ, Дронина ЮЕ, Галстян ГМ, Тартаковский ИС. Применение ПЦР для диагностики легионеллезной инфекции у гематологических больных. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2015;17(1):52-6.
28. Brüggemann H, Hagman A, Jules M, Sismeiro O, Dillies MA, Gouyette C, et al. Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol.* 2006 Aug;8(8):1228-40. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00703.x
29. Kenagy E, Priest PC, Cameron CM, Smith D, Scott P, Cho V, et al. Risk Factors for *Legionella longbeachae* Legionnaires' Disease, New Zealand. *Emerg Infect Dis.* 2017 Jul;23(7):1148-1154. DOI: 10.3201/eid2307.161429

References

1. Tartakovskiy IS, Adgamov RR, Ermolaeva SA, Dronina YuE, Karpova TI, Galstyan GM, et al. Methodology Issues of *Legionella Pneumonia* Diagnosis in Medical Institutions (Part 2). *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2013;1(3):166-72. (In Russian).
2. Tartakovskiy IS, Gruzdeva OA, Galstyan GM, Karpova TI. Profilaktika, diagnostika i lechenie legionelleza. Moscow, 2013. (In Russian).
3. Temezhnikova ND, Tartakovskii IS. Legionelleznaya infektsiya. Moscow: "Meditsina" Publ.; 2007. (In Russian).
4. Degtyar E, Zusman T, Ehrlich M, Segal G. A Legionella effector acquired from protozoa is involved in sphingolipids metabolism and is targeted to the host cell mitochondria. *Cell Microbiol.* 2009 Aug;11(8):1219-35. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01328.x
5. Tartakovskii IS. Diagnostika i profilaktika legionelleza. Poliklinika. 2015;6:40-3. (In Russian).
6. Eisenreich W, Heuner K. The life stage-specific pathometabolism of *Legionella pneumophila*. *FEBS Lett.* 2016 Nov;590(21):3868-3886. DOI: 10.1002/1873-3468.12326.
7. Onischenko GG, Demina YuV, Tartakovskiy IS. Modern conception of organization of epidemiological surveillance for legionella infections. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2009;5:85-91. (In Russian).
8. Shin S, Roy CR. Host cell processes that influence the intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol.* 2008 Jun;10(6):1209-20. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2008.01145.x
9. Correia AM, Ferreira JS, Borges V, Nunes A, Gomes B, Capucho R, et al. Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires' Disease. *N Engl J Med.* 2016 Feb 4;374(5):497-8. DOI: 10.1056/NEJMc1505356.
10. European Center for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease - Annual Epidemiological Report for 2015. ECDC; Stockholm, 2015.
11. Gomez-Valero L, Rusniok C, Buchrieser C. *Legionella pneumophila*: population genetics, phylogeny and genomics. *Infect Genet Evol.* 2009 Sep;9(5):727-39. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.05.004
12. Potočnjak M, Magdalenić Z, Dijan M, Rebić D, Gobin I. Environmental factors affecting the survival of soil dwelling *Legionella longbeachae* in water. *Ann Agric Environ Med.* 2016 Sep;23(3):452-5. DOI: 10.5604/12321966.1219186.
13. Schroeder GN, Petty NK, Mousnier A, Harding CR, Vogrin AJ, Wee B, et al. *Legionella pneumophila* Strain 130b Possesses a Unique Combination of Type IV Secretion Systems and Novel Dot/Icm Secretion System Effector Proteins. *J Bacteriol.* 2010 Nov;192(22):6001-16. DOI: 10.1128/JB.00778-10
14. Onishchenko GG, Pokrovsky VI, Tartakovskiy IS, Maleev VV, Lazikova GF., Chistyakova GG, Demina YuV, Karpova TI. Modern views on the epidemiology of legionellosis: operations procedure during epidemic outbreaks and preventive monitoring. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2008; 2:1-10. (In Russian).
15. Sadretdinova OV, Gruzdeva OA, Karpova TI, Alyapkina YuS, Dronina YuE, Fokina VG, Tartakovskiy IS. Contamination of hot water supply systems with *legionella pneumophila* in public buildings and medical care institutions. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2011;13(2):163-7. (In Russian).
16. Kozak NA, Buss M, Lucas CE, Frace M, Govil D, Travis T, et al. Virulence factors encoded by *Legionella longbeachae* identified on the basis of the genome

- sequence analysis of clinical isolate D-4968. *J Bacteriol.* 2010 Feb;192(4):1030-44. DOI: 10.1128/JB.01272-09
17. Mascarenhas DP, Zamboni DS. Inflammasome biology taught by *Legionella pneumophila*. *J Leukoc Biol.* 2017 Apr;101(4):841-849. DOI: 10.1189/jlb.3MR0916-380R
 18. Tartakovskii IS, Ginzburg AL, Lazikova GF, Chistyakova GG, Demina YuV, Karpova TI, et al. Standards for laboratory diagnostics of leg ionellosis and their application during epidemic outbreak of pneumonia in town verkhnyayapysh-ma. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2008;2:16-9. (In Russian).
 19. Tartakovskiy IS, Galstyan GM, Karpova TI, Katrysh SA, Dronina YuE, Sadretdinova OV. Methodology Issues of Legionella Pneumonia Diagnosis in Medical Institutions. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2012;14(2): 100-6. (In Russian).
 20. Onishehcnko GC, Lazikova GF, Chistyakova GG, Demina YuV, Nikonov BI, Romanenko VV, et al. Epidemiologic characteristic of le-gionnaires' disease outbreak in town Verkhnyaya Pyshma. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2008;2:82-5. (In Russian).
 21. Tartakovskiy IS, Sinopalnikov AI, Demina YuV, Gruzdeva OA. Prevention of Legionellosis as a Basis for the New Approach to Prophylaxis of Hospital-Acquired Infections. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2010;4:272-83. (In Russian).
 22. Fitzhenry R, Weiss D, Cimini D, Balter S, Boyd C, Alleyne L, et al. Legionnaires' Disease Outbreaks and Cooling Towers, New York City, New York, USA. *Emerg Infect Dis.* 2017 Nov;23(11). DOI: 10.3201/eid2311.161584.
 23. Marchello C, Dale AP, Thai TN, Han DS, Ebell MH. Prevalence of Atypical Pathogens in Patients With Cough and Community-Acquired Pneumonia: A Meta-Analysis. *Ann Fam Med.* 2016 Nov;14(6):552-566. DOI: 10.1370/afm.1993.
 24. Gruzdeva OA, Tartakovskiy IS. Relevant issues of epidemiology and laboratory diagnostics of legionellosis connected with providing medical aid. *Medical Almanac.* 2015;5(40):44-7. (In Russian).
 25. Rucinski SL, Murphy MP, Kies KD, Cunningham SA, Schuetz AN, Patel R. Eight Years of Clinical Legionella PCR Testing Illustrates a Seasonal Pattern. *J Infect Dis.* 2018 Jul 13;218(4):669-670. DOI: 10.1093/infdis/jiy201
 26. Karpova TI, Tartakovskiy IS. The features of epidemiology and laboratory diagnostics of legionellosis. *Infectious diseases: News, Opinions, Training.* 2015;4(13):51-8. (In Russian).
 27. Yatzyshina SB, Karpova TI, Marinenko OV, Dronina YuE, Galstyan GM, Tartakovskiy IS. Use of PCR for Diagnosis of Legionella Infection in Hematological Patients. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2015;17(1): 52-6. (In Russian).
 28. Brüggemann H, Hagman A, Jules M, Sismeiro O, Dillies MA, Gouyette C, et al. Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol.* 2006 Aug; 8(8):1228-40. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00703.x
 29. Kenagy E, Priest PC, Cameron CM, Smith D, Scott P, Cho V, et al. Risk Factors for *Legionella longbeachae* Legionnaires' Disease, New Zealand. *Emerg Infect Dis.* 2017 Jul;23(7):1148-1154. DOI: 10.3201/eid2307.161429

Информация об авторах:

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

Мицевич Ирина Петровна, научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0079

Information about authors:

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

Irina P. Mitsevich, researcher of Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

НОВОСТИ НАУКИ

Новый тип антибактериальных соединений

В настоящее время существует настоятельная необходимость в разработке новых антибактериальных средств для борьбы с распространением устойчивых к антибиотикам бактерий. Синтезированы новые функционализированные сахаром фосфониевые полимеры, проявляющие антибактериальную активность. Соединение поли(трис (гидроксипропил) винилбензилфосфонийхлорид) показало высокую активность как против грамположительных, так и грамотрицательных бактерий и очень низкую гемолитическую активность. Эти данные ставят под сомнение тот факт, что липофильные алкильные заместители необходимы для высокой антибактериальной активности и открывают перспективы для разработки новых классов антибактериальных полимеров.



Cuthbert TJ, Hisey B, Harrison TD, Trant JF, Gillies ER, Ragogna PJ.
*Surprising Antibacterial Activity and Selectivity of Hydrophilic Polyphosphoniums
Featuring Sugar and Hydroxy Substituents.*

Angew Chem Int Ed Engl. 2018 Sep 24;57(39):12707-12710. DOI: 10.1002/anie.201806412

Бактериология и инфекционная экология: новые перспективы исследования проявления патогенных свойств

Д.В. Николаенко

Ukrainian International Healthcare Ltd., Киев, Украина

В статье рассмотрены некоторые теоретические и методологические проблемы интерпретации феномена инфекции, инфекционных процессов и инфекционных заболеваний. Проведен критический анализ доминирующей парадигмы эпидемиологии. Развивается точка зрения, основанная на S-Theory.

Ключевые слова: кризис в эпидемиологии, инфекционная экология, инфекция

Для цитирования: Николаенко Д.В. Бактериология и инфекционная экология: новые перспективы исследования проявления патогенных свойств. Бактериология. 2018; 3(3): 68–77. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-68-77

Bacteriology and Infectious Ecology: new perspectives of research of the pathogenic properties

D.V. Nikolaenko

Ukrainian International Healthcare Ltd., Kiev, Ukraine

Some theoretical and methodological problems of interpretation of the phenomenon of infection, infectious processes and infectious diseases are considered. A critical analysis of the dominant paradigm of epidemiology. Developed point of view based on the S-Theory.

Keywords: crisis in epidemiology, infectious ecology, infection as a discrete property

For citation: Nikolaenko D.V. Bacteriology and Infectious Ecology: new perspectives of research of the pathogenic properties. Bacteriology. 2018; 3(3): 68–77. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-68-77

В развитии бактериологии открываются новые фундаментальные перспективы. Они связаны не только с автоматизацией проведения многих аналитических процедур и все большим использованием информационных технологий. На данном этапе использование ГИС-технологии позволяет определять географические координаты атрибутивной информации с точностью до 2 см. Это стало рутинной и касается информации любых природных сред, связанных с микроорганизмами. В том числе информации дискретного характера. Она может появляться раз в 20–30 лет или даже реже. Примером могут быть вспышки туляремии среди многочисленных видов теплокровных. Современные технологии позволяют регистрировать информацию по подобным вспышкам проявления патогенных свойств *Francisella tularensis* с точностью до нескольких сантиметров (пространство) и минут (время). Это стандарт современной инфекционной экологии [1–3]. Причина столь высокой точности реги-

страции эмпирической информации в принципиально новом фундаментальном понимании того, что есть туляремия. Она интерпретируется как дискретное свойство эпигеосистемы (*EGS/F. tularensis*) [4].

Для громадного большинства эпидемиологов это выглядит как нонсенс. Соответственно доминирующему стандарту ими собирается эмпирическая информация по циркуляции «заразного начала» у видов-резервуаров. Теоретические результаты подобных исследований адекватны их эмпирической основе. То есть много знают про микроорганизмы, но не понимают, когда они проявляют свои патогенные свойства в природе. На вопрос, почему возникает, скажем, эпидемия туляремии или эболы, ответа как не было, так и нет. Причина уклонения от вопроса в ограничениях доминирующей парадигмы. Диктатура одной парадигмы ведет к бесконечным повторам привычных результатов. Как реакция на подобное положение в экспертном сообществе возникают

Для корреспонденции:

Николаенко Дмитрий Васильевич, доктор географических наук, главный редактор журнала «Энvironmentальная эпидемиология»

Адрес: Украина, Киев, переулок К.Циолковского, 7/9
E-mail: profdmitrynikolaenko@gmail.com

Статья поступила 22.06.2018 г., принята к печати 29.10.2018 г.

For correspondence:

Dmitry V. Nikolaenko, PhD, DSc (geography), professor, Editor-in-Chief of journal «Environmental Epidemiology»

Address: 7/9 K.Tsiolkovsky lane, Kiev, Ukraine
E-mail: profdmitrynikolaenko@gmail.com

The article was received 22.06.2018, accepted for publication 29.10.2018

новые направления исследования. Примером является инфекционная экология. В ней делается акцент на исследование сложных связей и среды, стимулирующих проявление патогенных свойств микроорганизмов.

Целью статьи является привлечение внимания экспертного сообщества к новому фундаментальному пониманию природы проявления патогенных свойств микроорганизмов.

Принципиальные ограничения современной бактериологии, связанной с исследованием патогенных свойств микроорганизмов, в том, что она привязана к неэффективной и откровенно малоинтересной концепции «бесконечной циркуляции заразного начала в природе». Это далеко не лучший вариант осмысления проявления патогенных свойств микроорганизмов.

Обычно данная концепция ассоциируется с именем Е.Н.Павловского [5, 6]. В канонической форме она изложена в конце 1930-х годов. В 1960-е годы сформулирована в несколько более систематическом виде. Безраздельно доминирует до сих пор. Концепция так и не получила последовательного развития. Это не случайно. Последовательное развитие фундаментальной идеи, связанной с наличием «видов-резервуаров» в природе, неизбежно ведет к тому, что принципиальный тезис категорически не получает подтверждения. Есть масса информации, говорящей о том, что видов-резервуаров в природе не существует. Это лишь малообоснованная гипотеза. Можно сказать, что это «гипотеза-ширма». Нужно было сделать первоначальные привязки проявления патогенных свойств микроорганизмов к территориям. Это сделано за счет ссылок на ландшафты. Их понимание Е.Н.Павловским были поверхностным и далеким от того, что и как понимается в географической науке. Экотоны, геосистемы и масса иного остались вне поля зрения эпидемиологов.

Несостоятельность концепции видов-резервуаров и бесконечной циркуляции «заразного начала» в природе давно не секрет. Можно привести общеизвестный пример систематического выступления против данной концепции. Он связан с работой «группы Солдаткина» в «Микробе» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», прим. редактора) в конце 1970-х–начале 1980-х годов. Были проведены многолетние исследования и опубликованы десятки работ [7–19]. Результаты совершенно однозначно говорили о том, что бесконечной циркуляции «заразного начала» быть не может в принципе. Полученные новые фундаментальные научные результаты могли и должны были развиваться. Этого не произошло. Работа группы И.С.Солдаткина длилась недолго. Вскоре она свелась к вполне банальным исследованиям. Похоже, что авторы сами испугались своего «радикализма». Они оказались не готовы самостоятельно формулировать теоретические и методологические тезисы, противоречащие доминирующей концепции.

Много позже была разработана экологическая концепция Е.В.Ротшильда [20–24]. Она есть любопытный пример табуированной тематики в современной науке. Мое отношение к экологической концепции Е.В.Ротшильда критическое [25, 26]. Я вижу в ней немало слабостей, но это критика с позиций S-Theory и исследования дискретной интерпретации феномена манифестации патогенных свойств микроорганизмов [27]. Данная концепция – одна из первых, в которой

четко показано, что у инфекции дискретная природа. Наиболее интересные результаты связаны с чумой в естественных условиях.

Есть ли выход из создавшегося положения в исследовании патогенных свойств микроорганизмов? Неужели нет никакой альтернативы столь упрощенной концепции, на основании которой нет никакой возможности понять природу массивных проявлений инфекционной реальности?

Мне известны четыре последовательные теоретические концепции, в которых феномен инфекции рассматривается как дискретное явление.

1. Концепция Евгения Вейнберга (E.D. Weinberg). С начала 1960-х годов автор показывает, что в проявлении инфекционных заболеваний теплокровных металлы играют исключительно важную роль. Его работы можно отнести к медицине [28–32]. Подобных публикаций немногим более ста. Основная идея – инфекция есть свойство. Она есть явление дискретное и зависит от среды.

2. Концепция Марка Парди (Mark Purdey). В 1990-х – первой половине 2000-х годов им проведена серия исследований. Публикации чрезвычайно известные [33–37]. Вызвали громадный резонанс британской общественности. Среди западных экспертов данные исследования табуированы. Упомянуть Марка Парди в научном тексте означает гарантированно испортить отношения и показать свой «непрофессионализм». Автор декларирует тезис про инфекцию как свойство. Использование некоторых гербицидов в Великобритании стало причиной массивной вспышки заболеваний BSE. В 2018 г. сделана попытка начать обсуждение его концепции снова [38–43].

3. Концепция Евгения Ротшильда. Данный автор широко известен как эксперт по чуме [44, 45] и совсем не известен как создатель экологической концепции инфекционных заболеваний [20–24]. Концепцию можно определить и как микроэлементную. Более четверти века автор обращает внимание на роль микроэлементного состава почвы в манифестации патогенных свойств микроорганизмов.

4. S-Theory Дмитрия Николаенко. В четком виде теория сформулирована в 2010 г. По-прежнему развивается. Есть различные приложения [1, 27]. Введена новая терминология и новые таксономические единицы. Разработано представление относительно микрогеографии и нанокартографии при исследовании патогенных свойств микроорганизмов. Весьма значима методология ASTA (ASTA – Advanced Space – Time Algorithm of Site Detection). Это рациональный поиск мест, наиболее перспективных на проявление патогенных свойств микроорганизмов в естественных условиях. Точность определения таких мест до 1–2 см. Основные примеры приложения связаны с *Francisella tularensis* и *Bacillus anthracis*. Систематизирован громадный массив данных по сибирской язве в Российской империи и начата реконструкция их естественной географии.

У данных подходов различная терминология. Авторы рассматривают вопрос с позиций медицины (Е.Вейнберг), ветеринарии (М.Парди), привычной экологии (Е.Ротшильд) и инфекционной экологии (Д.Николаенко). Анализируются различные инфекционные заболевания. В этом мало общего, но у всех экспертов принципиальный вывод – феномен инфекции носит дискретный характер. Это всегда реакция на

некий сигнал внешней среды. Он связан с геохимическими и геофизическими характеристиками.

Четыре последовательных теоретика – это еще не все. Известны многочисленные частные подходы, в которых авторы без теоретической рефлексии говорят о том, что рассмотренный ими случай вспышки инфекционных заболеваний связан с дискретной активизацией патогена. Чаще всего причина определяется в использовании гербицидов. Приведу пример И.Т.Русева [46, 47]. Его вывод однозначен – гербициды являются причиной проявления туляремии.

Другой пример эксперта, который понимает значимость исследования инфекции как свойства, а не бесконечной циркуляции «заразного начала» в природе. У итальянского профессора Mario Zunino большое количество публикаций [48]. Он является общепризнанным экспертом в биогеографии. Идея инфекционной экологии для него совершенно естественна. Он многое знает о связях в природе и понимает, что у феномена инфекции должна быть сложная природа. Связь почвы, насекомых, растений, микроорганизмов может быть исследована на новом научном уровне.

У всего есть последствия. Расплачиваться за беспрецедентный консерватизм и категорическое нежелание обсуждать фундаментальные вопросы феномена инфекции, инфекционных процессов и инфекционных заболеваний приходится непониманием происходящего в инфекционной реальности. Есть множество примеров экспертного *непонимания* происходящего.

Снова можно вспомнить историю появления эболы и «новейшие новинки» ее манифестации. Первые случаи эболы были зарегистрированы в 1976 г. Удивительная вспышка произошла в 2014 г. Сделано невероятное количество публикаций. Принципиально важно, что доминирующее объяснение эболы пошло по пути поиска видов-резервуаров [49–58]. Так и только так. А где была эбола до 1976 г.? Филовирусы появились не вчера. Летучие мыши как «вид-резервуар» также живут на планете Земля миллионы лет. Как объяснить феномен 2014 г.? Он связан с тем, что виды-резервуары по *Ebolavirus* неожиданно расплодилось? Ничего подобного не было зарегистрировано. Но много лет регистрируется массовое вымирание человекообразных обезьян от эболы [59–62]. Этот массовый и недавний феномен беспокоит только приматологов. Их волнует сокращение количества приматов. В эпидемиологии феномен массового вымирания приматов от эболы не получает никакой оценки.

Были высказаны альтернативные фундаментальные точки зрения на эболу 2014 г. Причины связаны с микроэлементной динамикой в почвах [63–65]. Экологическая концепция Е.В.Ротшильда и S-Theory Д.Николаенко, на основании которых было дано объяснение, существенно различаются, но принципиальное объяснение совпадает. Генерируется сигнал для активизации патогенных свойств филовирусов. Меняется их экология. Начинается адаптационный процесс. Использование гербицидов (глифосфата в частности), которые накладываются на естественную географию филовирусов, является причиной манифестации этого заболевания. Можно провести предельно точно локализованные исследования в местах манифестации эболы. Появится новое фундаментальное понимание эболы, проявления патогенных свойств филовирусов в целом.

Как реакция на догматизм эпидемиологии появилась инфекционная экология. В ее основании новая парадигма. Для нее характерны новые теоретические постулаты. В новом подходе инфекции, инфекционные процессы и инфекционные заболевания стали четко различаться. Появляется возможность регистрации громадного массива информации, которая ранее терялась. Инфекция понимается как дискретное свойство природы. Дискретность проявления инфекционной реальности – ее основная характеристика. Есть манифестация и в виде инфекционных цепей, но она носит кратковременный характер. Такие цепи не могут быть перманентными.

Вводится представление относительно различных типов инфекционных процессов. Показано, что могут быть адаптационные инфекции. К ним относятся прионные заболевания [66–68]. Происходит то же, что и всегда, но процесс протекает чрезвычайно медленно. Вероятно, это основное отличие прионных заболеваний теплокровных. Под новые теоретические тезисы вводится новая методология исследований. Меняется если не все, то очень многое.

Для понимания места инфекционной экологии в системе наук нужно учесть опыт развития экологии в целом. В 2018 г. к ней все привыкли. Экология рассматривается как нечто совершенно естественное в экспертной рефлексии. Но так было далеко не всегда. Экология прошла длительный период игнорирования. Причины были различными. В том числе связанными с позицией экспертного сообщества. Проявился полный спектр консерватизма и уклонения от корректной оценки данной научной новинки.

Не стоит упражняться в определении того, *что есть инфекционная экология как научное направление*. Скажем только, что это профессиональная рефлексия относительно взаимодействия живых организмов, их сообществ, окружающей их среды и инфекционной реакции на перемены. Можно использовать и термин «адаптации к переменам». Инфекционная экология как научное направление – это:

- **исследование взаимодействия.** Дело в связях. Они есть объект исследования в экологии. Это некое состояние, возникающее между микроорганизмами и объектами;
- **исследование сообществ.** Дело не только (и не столько!) в отдельно взятом микроорганизме. Он никогда не существует сам по себе;
- **исследование окружающей среды микроорганизмов.** У каждого микроорганизма есть своя характерная среда;
- **исследование адаптации микроорганизмов к окружающей среде.** Это некое результирующее состояние сложной системы перемен в отношениях микроорганизма, его сообщества и их окружающей среды.

У инфекционной экологии большое количество точек соприкосновения с существующими научными дисциплинами. Ее место в системе наук отображено на рис. 1.

Специфику объекта исследования инфекционной экологии можно определить как набор ряда предметных (атрибутивных) составляющих (рис. 2).

Соотношения между указанными атрибутивными составляющими неоднозначны. В системе их отношений есть большое количество вариаций. Природа играет инфекционный джаз. В нем нет четко прописанной партитуры, которая исполняется всегда одинаково и в одно и то же время. Есть



Рис. 1. Место инфекционной экологии в системе наук.

лишь некоторые закономерности. Они вариативны по своей природе. Причина вариативности в сложности связей. В том числе вариативна вирулентность проявления патогенных свойств микроорганизмов. Вирулентность – одна из многочисленных характеристик, проявляющихся в специфическом случае процесса дискретной активизации патогенов. Инфекционный процесс есть результат всей указанной системы связей. Его понимание может быть достигнуто только на строго определенном гносеологическом основании.

Есть шокирующие примеры проявления вариативности вирулентности. Скажем, проявления «испанки» (La Grippe Espagnole, La Pesadilla). Итогом данной пандемии стала поразительно высокая смертность. Причины пандемии нужно искать в специфике WWI (Первая мировая война. – Прим. редактора) и тех микроэлементных переменных, которые были с ней связаны. Война, помимо всего прочего, означает вторжение в мир экологии микроорганизмов. Уникальность WWI и произошедших геохимических переменных, которые были с ней связаны, породили и уникальную вирулентность вируса H1N1.

Ситуация типичная. На основании доминирующей парадигмы эпидемиологии можно детально реконструировать губительный вирус, но понять специфику пандемии испанского гриппа нет никакой возможности. Причины а) пандемии и б) беспрецедентной вирулентности вируса H1N1 могут быть поняты на основании инфекционной экологии.

Некоторые примеры того, что и как можно делать с новых теоретических и методологических позиций. Четыре различных примера.

Пример 1. Сибирская язва в районе Ново-Ладожского канала. Канал был спроектирован и начал строиться в середине XIX века. Это стало инфекционной катастрофой. Вероятно, это самая длительная и мощная активизация *Bacillus anthracis*, зарегистрированная в мире за весь период наблюдений. Из масштабного исследования сибирской язвы, проявившейся при строительстве Ново-Ладожского канала, выросла российская имперская эпидемиология и ветеринария.

В 2012–2015 гг. проделана большая работа по реконструкции происходящего при строительстве данного канала

Дискретная активизация патогенов и инфекционные процессы	1. Микроорганизм
	2. Сообщество микроорганизмов
	3. Окружающая среда микроорганизма
	4. Адаптация микроорганизмов и сообществ к переменам
	5. Инфекция как новая и факультативная информация природы
	6. Инфекционный процесс как факультативный сценарий адаптации
	7. Инфекционное заболевание особей определенных биологических видов

Рис. 2. Атрибутивные составляющие объекта исследования инфекционной экологии.

в 1860–1890-е гг. [69–75]. С высокой степенью точности можно определить места для проведения экспедиционной работы на полигонах и микрополигонах в этом районе. В том числе работы экспериментальной. Речь относительно исследования экологии патогена в ее естественных условиях. Это уникальный пример все еще живой экологии *Bacillus anthracis*.

На основании палеоэпидемиологических исследований, проведенных по району Ново-Ладожского канала, можно с точностью до 30–40 м определить места, перспективные в отношении исследования экологии патогена. Речь идет относительно глубин в 2–4 м. После проведения пилотных полевых исследований точность локализации может быть повышена до 2–3 м. Работа выполняется на основании методологии ASTA. В данном случае речь идет относительно исследования EGS/*B. anthracis*. Итогом станет понимание экологии *Bacillus anthracis* и выход на исследования естественной географии патогенов.

Пример 2. Туляремия и проявления патогенных свойств *Francisella tularensis* в связи с переменами в микроэлементном составе почвы. Первый случай дискретной активизации *Francisella tularensis* связан с естественной активизацией. Она носит чисто природный характер. Как показали детальные исследования В.Л.Адамовича, проведенные в 1960–80-е годы, манифестация туляремии в Полесье чаще всего связана с экотонами [76, 77]. Наиболее перспективными являются черноольшанники. У черной ольхи (*Álnus glutinósa*) есть естественный паразит (*Frankia alni*) [78, 79]. Заражение корней черной ольхи ведет к тому, что меняется микроэлементный состав почвы на очень небольшом участке. Это деликатные природные перемены, которые непросто заметить. Для исследования нужно некоторое количество деревьев черной ольхи с корневой системой, зараженной и не зараженной *Fr. alni*. Риски появления туляремии напрямую зависят от микроэлементных градиентов. Грызуны имеют различные риски заболевания туляремией в зависимости от того, находятся ли они в непосредственной близости от корневой системы черной ольхи, зараженной *Fr. alni*. Расстояния в несколько сантиметров начинают играть существенную роль [80].

Есть методология детальных микроэлементных исследований. Это STMM (Space-Time Multi parametric Matrix). Метод позволяет провести детальное исследование динамики микроэлементной среды и выйти на понимание феноменологии проявления дискретной активизации патогенных свойств.

Второй случай связан с антропогенной активизацией патогенных свойств *Francisella tularensis*. Рабочая гипотеза

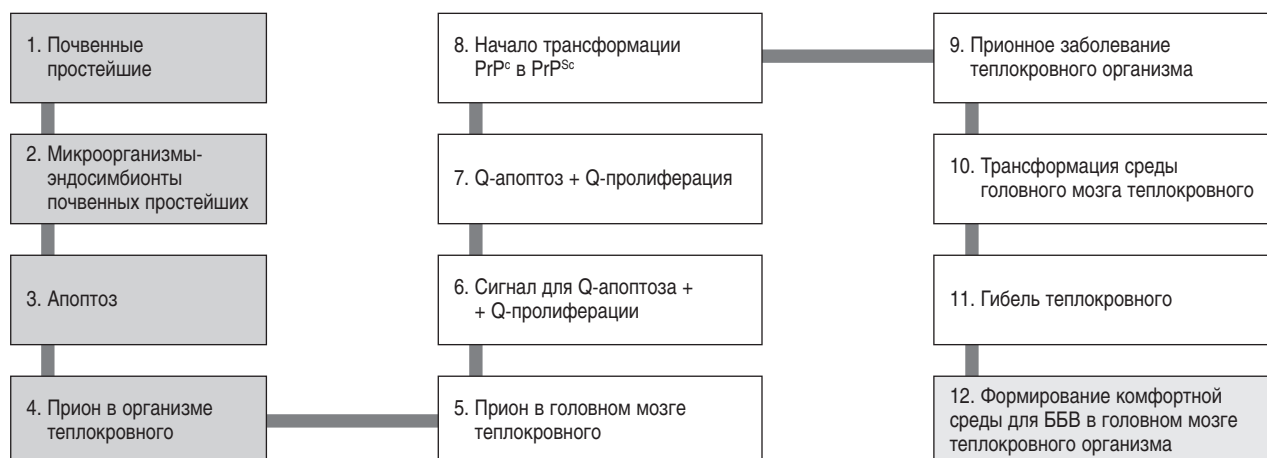


Рис. 3. Гипотетическая связь этапов в процессе возникновения, развития и завершения прионного заболевания теплокровного.

состоит в том, что использование определенных гербицидов может вести к массивным вспышкам инфекционной активности. Примером может быть история вспышки заболевания туляремией в 2015 г. в Ханты-Мансийске. Ввиду краткости статьи нет возможности излагать детали подобных исследований.

Пример 3. «Окопная лихорадка» имеет различные названия [81, 82]. Заболевание теплокровных связано с риккетсиями *Rochalimaea quintana*. Оно было зарегистрировано после того, как в строго определенных районах (в том числе на Волыни) люди стали массивно проводить земляные работы (рытье окопов). Это нужно интерпретировать как пример массивных экологических перемен для *Rochalimaea quintana*. Произошла резкая перемена экологии микроорганизма. Возникает адаптивная реакция, и, как ее следствие, происходит активизация патогенных свойств. Строго определенные условия окопного быта привели к возникновению вполне устойчивых инфекционных цепей.

Пример 4. Разработана адаптационная гипотеза прионных заболеваний как случай последовательного применения S-Theory [66–68]. Она может быть продуктивным основанием понимания столь крошечного сегмента инфекционной реальности, как трансформация PrP^c в PrP^{Sc}. Есть сложная пространственно-временная (экологическая) связь проявления процесса первоначального превращения PrP^c в PrP^{Sc}. Ее можно определить следующим образом (рис. 3). На схеме описан вариант первоначального прионного заражения. Количественные характеристики такого процесса могут быть очень незначительными для случаев заражения людей и вполне значимыми для случаев заражения овец. Это проявляется при почесухе (*scrapie*). Трансмиссивная манифестация прионных заболеваний есть иной вид инфекционной реальности. Ее исследование стоит четко отделять от первоначального процесса трансформации PrP^c в PrP^{Sc} в организме. Основные тезисы адаптационной гипотезы следующие:

- белок–белковое взаимодействие (ББВ) – одна из наиболее распространенных процедур в природе планеты Земля. Следовательно, для понимания трансформации PrP^c в его конформационную форму PrP^{Sc} не нужно искать некие особые причины, кроме как связанные со средой. Часть сред интерпретируется ББВ как агрессивные. Вступают

в силу адаптационные механизмы. Следствием является трансформация PrP^c в PrP^{Sc};

- головной мозг теплокровных (в природе планеты Земля) появился намного позже времени формирования стандарта ББВ. Механизм трансформации PrP^c в PrP^{Sc} сформировался ранее. Головной мозг является агрессивной микроэлементной и электромагнитной средой для нормального ББВ. При условии попадания прионов в мозг начинается адаптационный процесс. Проявляется Q-апоптоз. Следствием Q-апоптоза являются те или иные прионные инфекционные заболевания теплокровных;

- с точки зрения ББВ, в конечном итоге трансформации головного мозга формируется комфортная микроэлементная и электромагнитная среда. Прионы воспринимают мир через призму микроэлементного и электромагнитного полей. Они могут обладать адаптивными свойствами и формировать своей комфортный вариант среды. Следуя логике адаптационной гипотезы, можно предположить, что на терминальной для теплокровного стадии феномен Q-апоптоза прекращает иметь место. В нем больше нет необходимости. Агрессивная среда в виде головного мозга теплокровного преобразована. Данный тезис может быть верифицирован с высокой степенью точности. Он имеет важное значение для понимания сути прионных заболеваний в целом.

Выводы

1. Бактериология совершенно не обязательно должна быть связана только с эпидемиологией в ее современном понимании и базироваться на концепции «бесконечной циркуляции заразного начала в природе». Это только одна из возможных версий. Она ведет к большим потерям информации и неэффективна. Намного более интересной может быть связь с инфекционной экологией. Она ориентирована на детальное исследование сложных связей, возникающих в процессе дискретной активизации патогенов и среды, содержащей ключевую информацию для этого процесса.

2. Инфекционная экология есть направление исследований. Его не стоит связывать с определенной теорией или методологией. Могут быть существенно различные версии реализации потенциала инфекционной экологии. Автор базируется на S-Theory. При этом есть понимание, что могут

быть и иные версии теоретического объяснения инфекционных перемен. Объект исследования слишком сложен и многогранен. Природа играет инфекционный джаз, и его теоретическое осмысление не может быть сделано только с одной экспертной позиции.

3. В процессе дискретной активизации патогенных свойств микроорганизмов исключительно большую роль играют микроэлементные градиенты, как естественные, так и антропогенные. Они могут быть различного типа. Соответственно этому может существенно различаться проявление патогенных свойств микроорганизмов.

4. Вирулентность манифестации патогенных свойств микроорганизмов можно интерпретировать как функцию микроэлементного градиента экотона, вызывающего адаптивную реакцию микроорганизма и его экологической системы. Вероятно, это основное в манифестации конкретной версии проявления вирулентности. Она есть характеристика, вариативная по своей природе.

5. Процесс дискретной активизации патогенных свойств микроорганизмов может быть детально исследован. Для реализации этой потенциальной возможности нужно менять стратегию. Нужны геостационарные исследования. Есть методология, позволяющая проводить геостационарные исследования на принципиально новом уровне. Она разработана на основании S-Theory.

6. S-Theory включает априорный тезис относительно существования естественной географии микроорганизмов, включая патогенные. Естественная география микроорганизмов очень слабо изучена. Это результат экспертного непонимания ее значимости. Разработана методология АСТА, позволяющая проводить детальные исследования на территориях, перспективных на различного рода патогенные микроорганизмы.

7. Можно четко и однозначно утверждать, что на современном уровне есть возможность интерпретировать природу проявления патогенных свойств микроорганизмов на новом научном уровне. Впрочем, можно этого и не делать. У экспертного сообщества, связанного с исследованием патогенных свойств микроорганизмов, отличный выбор фундаментальных позиций. Это всегда интересно и перспективно.

Литература

1. Николаенко Д. Введение в инфекционную экологию. Энвайронментальная эпидемиология. 2018;12(2-3):3-692.
2. Николаенко Д. Объект исследования инфекционной экологии и ее отличия от эпидемиологии. Энвайронментальная эпидемиология. 2018;12(4):37-51. DOI: 10.13140/RG.2.2.22957.18408
3. Николаенко Д. Инфекционная экология как новое направление научных исследований. Экология, защита среды и сбалансированное развитие: образование – наука – производство. Харьков, ККНУ; 2017, с. 161-3.
4. Николаенко Д. Профессор В.Л. Адамович и новая парадигма энвайронментальной эпидемиологии. Энвайронментальная эпидемиология. 2016; 10(5-6):3-190.
5. Павловский ЕН. Учение о природной очаговости. Журнал общей биологии. 1946;1:1-33.
6. Павловский ЕН. Природная очаговость трансмиссивных болезней в связи с ландшафтной эпидемиологией зооантропонозов. М.; Л., 1964, 211 с.
7. Дорожко ОВ, Журавлев ИЯ, Ротшильд ЕВ, Кондрашин ЮИ. Лизогения по фагам, специфичным для *Yersinia pestis*, у бактерий микробиоценозов диких грызунов – носителей чумы. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1980;8:38-46.
8. Дорожко ОВ, Ротшильд ЕВ. Микроэлементы в жизнедеятельности патогенных и некоторых других микроорганизмов. Успехи современной биологии. 1985;99(2):313-9.
9. Жулидов АВ, Ротшильд ЕВ, Дзядевич ГС. Особенности микроэлементного состава растений в местах локальных эпизоотий чумы. Вестник МГУ. Серия 5, География. 1981;1:57-61.
10. Журавлев ИЯ, Ермилов АП, Ротшильд ЕВ, Бондаренко НМ, Чикризов ФД. Наблюдения по экологии чумных умеренных бактериофагов, выделенных в природных очагах северного Прикаспия. Проблемы особо опасных инфекций. 1979;4(68):22-6.
11. Леви МИ. Реакция пассивной гемагглютинации при чуме – 25 лет борьбы, триумфа и ограничений. Занимательные очерки о деятельности и деятелях противочумной системы России и Советского Союза. Вып. 2. М.: Информика; 1995, с. 87-150.
12. Постников ГБ, Ротшильд ЕВ. Размещение и устойчивость поселений песчанок в юго-западной части Волго-Уральских песков по данным полевого картографирования. Бюллетень московского общества испытателей природы. Отдел биологический. 1985;90(3):3-10.
13. Ротшильд ЕВ, Жулидов АВ. Изменения микроэлементного состава растений как фактор чумной эпизоотии среди песчанок. Бюллетень московского общества испытателей природы. Отдел биологический. 2000;105(1):10-20.
14. Ротшильд ЕВ, Коробова ЕМ, Галацевич ПН, Пильников АЭ, Федоров ЮН. Связь чумных эпизоотий с аномалиями микроэлементного состава растений в горной лесостепи Тувы. Тез. докл. III Всесоюз. конф. по эпизоотологии. Новосибирск, 1991, с. 397-399.
15. Ротшильд ЕВ, Косой МЕ, Кушнарев ЕЛ. Микроэлементный состав растений и структура очагов вирусных зоонозов. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 1993, с. 72-81.
16. Руденчик ЮВ, Солдаткин ИС. История борьбы с природной очаговостью чумы. Отечественные уроки. Занимательные очерки о деятельности и деятелях противочумной системы России и Советского Союза. Вып. 2. М.: Информика; 1994, с. 61-85.
17. Руденчик ЮВ, Солдаткин ИС, Лубкова ИВ, Лобанов КН. Оценка связи эпизоотий чумы с численностью носителей и переносчиков в природных очагах. Эпидемиология и профилактика чумы и холеры. Саратов, 1983, с. 3-11.
18. Солдаткин ИС, Руденчик ЮВ. Некоторые вопросы энзоотии чумы как формы существования саморегулирующейся системы грызун-блоха-возбудитель. Фауна и экология грызунов. Вып. 10. М.: Изд. МГУ; 1971, с. 5-29.
19. Солдаткин ИС, Руденчик ЮВ. Эпизоотический процесс в природных очагах чумы (ревизия концепции). Экология возбудителей сапронозов. М., 1988, с. 117-131.
20. Ротшильд ЕВ. Зависимость инфекционных болезней от состава химических элементов в природной среде и периодический закон. Успехи современной биологии. 2001;31(3):252-65.
21. Ротшильд ЕВ. Инфекции в природе. Опасные недуги глазами натуралиста. Энвайронментальная эпидемиология. 2011;5(4):434-740.
22. Ротшильд ЕВ. Экологическая концепция в науке об инфекциях. Энвайронментальная эпидемиология. 2011;5:755-70.
23. Ротшильд ЕВ. Инфекции в природе. Опасные недуги глазами натуралиста. М.: ООО "АБФ"; 2012, 288 с.
24. Ротшильд ЕВ. Инфекции в природе. Экологическая концепция. 3-е издание. Энвайронментальная эпидемиология. 2014;8(2):7-279.
25. Николаенко Д. Предисловие к статье Е.В. Ротшильда «Экологическая концепция в науке об инфекциях». Энвайронментальная эпидемиология. 2016;10(1):14-8.

26. Николаенко Д. Концепция инфекционных заболеваний Е.В. Ротшильда. Интерпретация сибирской язвы. Энвайронментальная эпидемиология. 2016; 11(1):50-99.
27. Николаенко Д. S-Theory: новый взгляд на инфекции. Энвайронментальная эпидемиология. 2018;12(2-3):47-70. DOI: 10.13140/RG.2.2.11973.35043
28. Weinberg, Eugene. (1974). Iron and Susceptibility to Infectious Disease. Science (New York, N.Y.). 184. 952-6. 10.1126/science.184.4140.952.
29. Weinberg ED. Nutritional immunity. Host's attempt to withhold iron from microbial invaders. JAMA. 1975 Jan 6;231(1):39-41.
30. Weinberg ED. Iron and Infection. Microbiol Rev. 1978 Mar;42(1):45-66.
31. Weinberg ED. Iron withholding: a defense against infection and neoplasia. Physiol Rev. 1984 Jan;64(1):65-102. DOI: 10.1152/physrev.1984.64.1.65
32. Weinberg ED. Iron availability and infection. Biochim Biophys Acta. 2009 Jul; 1790(7):600-5. DOI: 10.1016/j.bbagen.2008.07.002.
33. Purdey M. Auburn university research substantiates the hypothesis that metal microcrystal nucleators initiate the pathogenesis of TSEs. Med Hypotheses. 2006;66(1):197-9. DOI: 10.1016/j.mehy.2005.07.025
34. Purdey M. Metal microcrystal pollutants: the heat resistant, transmissible nucleating agents that initiate the pathogenesis of TSEs? Med Hypotheses. 2005;65(3):448-77. DOI: 10.1016/j.mehy.2005.03.018
35. Purdey M. Elevated silver, barium and strontium in antlers, vegetation and soils sourced from CWD cluster areas: Do Ag/Ba/Sr piezoelectric crystals represent the transmissible pathogenic agent in TSEs? Med Hypotheses. 2004;63(2):211-25. DOI: 10.1016/j.mehy.2004.02.041
36. Purdey M. Does an ultra violet photooxidation of the manganese-loaded/copper-depleted prion protein in the retina initiate the pathogenesis of TSE? Med Hypotheses. 2001 Jul;57(1):29-45. DOI: 10.1054/mehy.2001.1305
37. Purdey M. Ecosystems supporting clusters of sporadic TSEs demonstrate excesses of the radical-generating divalent cation manganese and deficiencies of antioxidant co factors Cu, Se, Fe, Zn. Does a foreign cation substitution at prion protein's Cu domain initiate TSE? Med Hypotheses. 2000 Feb;54(2):278-306. DOI: 10.1054/mehy.1999.0836
38. Николаенко Д. Эволюция инфекционной экологии. Энвайронментальная эпидемиология. 2018;12(2-3):27-46. DOI: 10.13140/RG.2.2.33783.73129
39. Николаенко Д. История инфекционной экологии: Марк Парди. Энвайронментальная эпидемиология. 2018;12(4):52-82. DOI: 10.13140/RG.2.2.25226.36802
40. Тимошенко А, Королев А, Богачевская Е, Коваленко М. Предварительные результаты дискуссии на тему "Марк Парди и восприятие научных идей". Энвайронментальная эпидемиология. 2018;12(4):92-99. DOI: 10.13140/RG.2.2.22110.13123
41. Тимошенко А, Королев А. Марк Парди и постсоветское научное сообщество: почему столь плохо воспринимаются научные новинки? Энвайронментальная эпидемиология. 2018;12(4):83-91. DOI: 10.13140/RG.2.2.13328.30727
42. Богачевская Е, Тимошенко А. Динамика инфекционной реальности и стандарты экспертной рефлексии. Энвайронментальная эпидемиология. 2018;12(4):100-10. DOI: 10.13140/RG.2.2.27538.96961
43. Королев А, Коваленко М. Предположим Марк Парди жив ... Энвайронментальная эпидемиология. 2018;12(4):111-28. DOI: 10.13140/RG.2.2.25226.36802
44. Ротшильд ЕВ. Пространственная структура природного очага чумы и методы ее изучения (на примере северной подзоны Арало-Каспийских пустынь). Дисс. ... доктора биологических наук. Саратов. Всесоюзный научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», 1973.
45. Ротшильд ЕВ. Пространственная структура природного очага чумы и методы ее изучения. М.: МГУ; 1978, 192 с.
46. Русев ИТ. Экосистемы Северо-Западного Причерноморья как основа формирования опасных фаунистических комплексов и их структурно-функциональная организация. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. Одесса, 2013, 393 с.
47. Русев ИТ. Пестицид ДДТ как провоцирующий фактор активизации паразитарной экосистемы туляремии на острове Бирючий. Экосистемы, их оптимизация и охрана. 2011;4:144-56.
48. https://www.researchgate.net/profile/Mario_Zunino/publications
49. <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/index.html>
50. Leendertz SA, Gogarten JF, Dux A, Calvignac-Spencer S, Leendertz FH. Assessing the Evidence Supporting Fruit Bats as the Primary Reservoirs for Ebola Viruses. Ecohealth. 2016 Mar;13(1):18-25. DOI: 10.1007/s10393-015-1053-0.
51. Plowright RK, Eby P, Hudson PJ, Smith IL, Westcott D, Bryden WL, et al. Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. Proc Biol Sci. 2015 Jan 7; 282(1798):20142124. doi: 10.1098/rspb.2014.2124
52. Paweska JT, Jansen van Vuren P, Fenton KA, Graves K, Grobbelaar AA, Moolla N, et al. Lack of Marburg Virus Transmission From Experimentally Infected to Susceptible In-Contact Egyptian Fruit Bats. J Infect Dis. 2015 Oct 1;212 Suppl 2:S109-18. DOI: 10.1093/infdis/jiv132.
53. Ogawa H, Miyamoto H, Nakayama E, Yoshida R, Nakamura I, Sawa H, et al. Seroepidemiological Prevalence of Multiple Species of Filoviruses in Fruit Bats (Eidolon helvum) Migrating in Africa. J Infect Dis. 2015 Oct 1;212 Suppl 2:S101-8. DOI: 10.1093/infdis/jiv063
54. Hayman DT. Biannual birth pulses allow filoviruses to persist in bat populations. Proc Biol Sci. 2015 Mar 22;282(1803):20142591. DOI: 10.1098/rspb.2014.2591.
55. Mari Saéz A, Weiss S, Nowak K, Lapeyre V, Zimmermann F, Dux A, et al. Investigating the zoonotic origin of the West African Ebola epidemic. EMBO Mol Med. 2015 Jan;7(1):17-23. DOI: 10.15252/emmm.201404792.
56. Genton C, Cristescu R, Gatti S, Levréro F, Bigot E, Motsch P, et al. Using demographic characteristics of populations to detect spatial fragmentation following suspected ebola outbreaks in great apes. Am J Phys Anthropol. 2017 Sep;164(1): 3-10. DOI: 10.1002/ajpa.23275.
57. Alexander KA, Sanderson CE, Marathe M, Lewis BL, Rivers CM, Shaman J, et al. What Factors Might Have Led to the Emergence of Ebola in West Africa? PLoS Negl Trop Dis. 2015 Jun 4;9(6):e0003652. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003652
58. Pigott DM, Golding N, Mylne A, Huang Z, Henry AJ, Weiss DJ, et al. Mapping the zoonotic niche of Ebola virus disease in Africa. Elife. 2014 Sep 8;3:e04395. DOI: 10.7554/eLife.04395.
59. Gouar, Pascaline & Le Thiec, Sandra & Pierre, Amandine & Genton, Céline & Pierre, Jean-Sébastien & Schaub, Michael & Ménard, Nelly Demography and sociality: Elasticity analysis in a gorilla population affected by an Ebola outbreak. 2015.
60. Genton C, Pierre A, Cristescu R, Lévréro F, Gatti S, Pierre JS, et al. How Ebola impacts social dynamics in gorillas: A multistate modelling approach. J Anim Ecol. 2015 Jan;84(1):166-76. DOI: 10.1111/1365-2656.12268
61. Genton, Céline. (2012). Recovery capabilities of a population of lowland gorillas Western Gorilla (Gorilla gorilla gorilla) following a demographic collapse caused by an Ebola epidemic.
62. Genton C, Cristescu R, Gatti S, Levréro F, Bigot E, Caillaud D, et al. Recovery Potential of a Western Lowland Gorilla Population following a Major Ebola Outbreak: Results from a Ten Year Study. PLoS One. 2012;7(5):e37106. DOI: 10.1371/journal.pone.0037106.
63. Ротшильд ЕВ. Экология лихорадки эболы в свете природной модели болезней. Микрорезультаты в медицине. 2015;16(3):3-11.
64. Николаенко Д. Глифосат как наиболее вероятная причина эболы в Центральной и Западной Африке. Энвайронментальная эпидемиология. 2014;8(1): 149-62.
65. Николаенко Д. Глифосат и эбола: гербициды и дискретная активизация патогенов. Энвайронментальная эпидемиология. 2018;12(2-3):436-45. DOI: 10.13140/RG.2.2.36141.38884.
66. Николаенко Д. Основания адаптационной гипотезы нейродегенеративных изменений мозга теплокровных в результате трансформации PrPc в PrPSc. Энвайронментальная эпидемиология. 2018;12(4):4-17.

67. Nikolaenko D. Adaptation hypothesis of neurodegenerative changes in the brain as a result of the transformation of PrPc in PrPSc. *Environmental Epidemiology*. 2018;12(4):18-25.
68. Николаенко Д. Q-апоптоз и Q-пролиферация как физиологическая основа нейродегенеративных изменений мозга теплокровных животных. *Энвайронментальная эпидемиология*. 2017;11(3):40-5.
69. Nikolaenko D. Introduction to the information system "Anthrax in the Russian Empire" (version 1.0). *Environmental Epidemiology*. 2014;8(1):51-112.
70. Николаенко Д. Сибирская язва в Российской империи. Первая книга. *Энвайронментальная эпидемиология*. 2013;7(1-2):4-411.
71. Николаенко Д. Статистика манифестации сибирской язвы в Российской империи. Часть 1. *Энвайронментальная эпидемиология*. 2014;8(3):276-449.
72. Николаенко Д. Палеоэпидемиология инфекционных заболеваний как новое научное направление. *Энвайронментальная эпидемиология*. 2018;12(2-3):198-225. DOI: 10.13140/RG.2.2.33921.35686
73. Палеоэпидемиология сибирской язвы в Российской империи. Том 1. Под редакцией Дмитрия Николаенко. *Энвайронментальная эпидемиология*. 2013;7(3):4-294.
74. Палеоэпидемиология сибирской язвы в Российской империи. Том 13. Под редакцией Дмитрия Николаенко. *Энвайронментальная эпидемиология*. 2017;11(2):3-356.
75. Палеоэпидемиология сибирской язвы в Российской империи. Том 14. Под редакцией Дмитрия Николаенко. *Энвайронментальная эпидемиология*. 2017;11(4):4-205.
76. Адамович ВЛ. Ландшафтно-экологические исследования эпидемиологии зоонозных инфекций. Автореферат дисс. ... доктора биол. наук: 14.00.30. В.Л.Адамович. Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии МЗ СССР. М., 1983, 27 с.
77. Адамович ВЛ. Ландшафтно-экологические исследования в эпидемиологии зоонозных инфекций. Автореферат дисс. ... доктора биол. наук: 14.00.30. В.Л.Адамович. Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии МЗ СССР. М., 1984, 43 с.
78. Alloisio N1, Queirox C, Fournier P, Pujic P, Normand P, Vallenet D, et al. The Frankia alni Symbiotic Transcriptome. *Mol Plant Microbe Interact*. 2010 May; 23(5):593-607. DOI: 10.1094/MPMI-23-5-0593.
79. Lorena Carro, Tomas Persson, Petar Pujic, Nicole Alloisio, Pascale Fournier, Hasna Boubakri, Katharina Pawlowski, Philippe Normand. Organic acids metabolism in Frankia alni. *Symbiosis*. 2016;70(1-3):37-48. DOI: 10.1007/s13199-016-0404-0
80. Nikolaenko Dmitry. Impact of soil environment, created nitrogen-fixing bacterium Frankia Alni on specific of symbiotic relations between A. castellanii and F. tularensis in Alnus glutinosa forest and dynamic of manifestation pathogens activity by F. Tularensis. April 2018. DOI: 10.13140/RG.2.2.29211.36642
81. Maurin M, Raoult D. Bartonella (Rochalimaea) quintana infections. *Clin Microbiol Rev*. 1996 Jul;9(3):273-92.
82. Myers WF, Wisseman CL Jr, Fiset P, Oaks EV, Smith JF. Taxonomic relationship of vole agent to Rochalimaea quintana. *Infect Immun*. 1979 Dec;26(3):976-83.
4. Nikolaenko D. Professor V.L. Adamovich and new paradigm of Environmental Epidemiology. *Environmental Epidemiology*. 2016;10(5-6):3-190. (In Russian).
5. Pavlovskii EN. Uchenie o prirodnoi ochagovosti. *Zhurnal obshchei biologii*. 1946;1:1-33.
6. Pavlovsky E.N. The natural foci of vector-borne diseases in connection with the landscape epidemiology of zoonosis. Moscow, 1964, 211 p. (In Russian).
7. Dorozhko OV, Zhuravlev IYa, Rotshil'd EV, Kondrashin Yul. Lysogeny of phages specific for Yersinia pestis in bacteria of wild rodent microbiocenosis that carries plague. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1980;8:38-46. (In Russian).
8. Dorozhko OV, Rothschild E.V. Trace elements in the life of pathogens and some other microorganisms. *Biology Bulletin Reviews*. 1985;99(2):313-9. (In Russian).
9. Zhulidov A.V., Rothschild E.V., Dzyadevich G.S. Features of the trace element composition of plants in places of local plague epizootic. *Moscow University Bulletin. Series 5. Geography*. 1981;1:57-61. (In Russian).
10. Zhuravlev IYa, Yermilov AP, Rothschild EV, Bondarenko NM, Chikrizov FD. Observations on the ecology of plague temperate bacteriophages isolated in natural foci of the northern Caspian. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 1979;4(68):22-6. (In Russian).
11. Levi MI. The reaction of passive hemagglutination in the plague – 25 years of struggle, triumph and limitations. Interesting essays on the activities and figures of the anti-plague system in Russia and the Soviet Union. Vol. 2. Moscow: "Informika" Publ; 1995, pp. 87-150. (In Russian).
12. Postnikov GB, Rothschild EV. Location and stability of gerbil settlements in the south-western part of the Volga-Ural sands according to field mapping data. *Bulletin of Moscow Society of Naturalists. Biological series*. 1985;90(3):3-10. (In Russian).
13. Rothschild EV, Zhulidov AV. Changes in the microelement composition of plants as a factor of plague epizootics among gerbils. *Bulletin of the Moscow Society of Nature Testers. Biological series Bulletin of Moscow Society of Naturalists. Biological series*. 2000;105(1):10-20. (In Russian).
14. Rothschild, EV, Korobova, EM, Galatsevich PN, Pil'nikov AE, Fedorov YuN. Connection of plague epizootics with anomalies of the trace element composition of plants in the mountain steppe of Tuva. *Proceedings of III all-Union conference by epizootology*. Novosibirsk, 1991, pp. 397-399. (In Russian).
15. Rothschild E.V., Kosoi M.E., Kushnarev E.L. The trace element composition of plants and the structure of foci of viral zoonoses. *Prob. especially dangerous infections*. Saratov, 1993, pp. 72-81. (In Russian).
16. Rudenchik YuV, Soldatkin IS. The history of the fight against the natural foci of the plague. Domestic lessons. Interesting essays on the activities and figures of the anti-plague system in Russia and the Soviet Union. Vol. 2. Moscow: "Informika" Publ.; 1994, pp. 61-85. (In Russian).
17. Rudenchik YuV, Soldatkin IS. The history of the fight against the natural foci of the plague. Domestic lessons. Interesting essays on the activities and figures of the anti-plague system in Russia and the Soviet Union, 1983, pp. 3-11. (In Russian).
18. Soldatkin IS, Rudenchik YuV. Some questions of plague enzootic as a form of the existence of a self-regulating rodent-flea-pathogen system. *Rodent fauna and ecology*. Vol. 10. Moscow: Moscow State University Publ.; 1971, pp. 5-29. (In Russian).
19. Soldatkin IS, Rudenchik YuV. Epizootic process in natural foci of the plague (revision of the concept). *Ecology of causative agents of saponosis*. Moscow, 1988, pp. 117-131. (In Russian).
20. Rothschild EV. The dependence of infectious diseases on the composition of chemical elements in the natural environment and periodic law. *Biology Bulletin Reviews*. 2001;31(3):252-65. (In Russian).
21. Rothschild EV. Infections in nature. Dangerous illnesses through the eyes of a naturalist. *Environmental Epidemiology*. 2011;5(4):434-740. (In Russian).
22. Rothschild EV. Ecological concept in the science of infections. *Environmental Epidemiology*. 2011;5:755-70. (In Russian).

References

1. Nikolaenko D. Introduction to infectious ecology. *Environmental Epidemiology*. 2018;12(2-3):3-692. (In Russian).
2. Nikolaenko D. Infectious ecology research object and its differences from epidemiology. *Environmental Epidemiology*. 2018;12(4):37-51. DOI: 10.13140/RG.2.2.22957.18408 (In Russian).
3. Nikolaenko D. Infectious ecology as a new direction of scientific research. Ecology, environmental protection and balanced environmental management: education – science – production – 2017. – Kharkiv, 2017, с. 161-3. (In Russian).

23. Rothschild EV. Infections in nature. Dangerous illnesses through the eyes of a naturalist. Moscow: OOO "ABF" Publ.; 2012, 288 p. (In Russian).
24. Rothschild E.V. Infections in nature. Ecological concept. 3rd edition. Environmental Epidemiology. 2014;8(2):7-279. (In Russian).
25. Nikolaenko D. Preface to the article by E.V.Rothschild "Ecological concept in the science of infections". Environmental Epidemiology. 2016;10(1):14-8. (In Russian).
26. Nikolaenko D. The concept of infectious diseases E.V. Rothschild. Interpretation of anthrax. Environmental Epidemiology. 2016;11(1):50-99. (In Russian).
27. Nikolaenko D. S-Theory: A New Look at Infections. Environmental Epidemiology. 2018;12(2-3):47-70. DOI: 10.13140/RG.2.2.11973.35043 (In Russian).
28. Weinberg, Eugene. (1974). Iron and Susceptibility to Infectious Disease. Science (New York, N.Y.). 184. 952-6. 10.1126/science.184.4140.952.
29. Weinberg ED. Nutritional immunity. Host's attempt to withhold iron from microbial invaders. JAMA. 1975 Jan 6;231(1):39-41.
30. Weinberg ED. Iron and Infection. Microbiol Rev. 1978 Mar;42(1):45-66.
31. Weinberg ED. Iron withholding: a defense against infection and neoplasia. Physiol Rev. 1984 Jan;64(1):65-102. DOI: 10.1152/physrev.1984.64.1.65
32. Weinberg ED. Iron availability and infection. Biochim Biophys Acta. 2009 Jul;1790(7):600-5. DOI: 10.1016/j.bbagen.2008.07.002.
33. Purdey M. Auburn university research substantiates the hypothesis that metal microcrystal nucleators initiate the pathogenesis of TSEs. Med Hypotheses. 2006;66(1):197-9. DOI: 10.1016/j.mehy.2005.07.025
34. Purdey M. Metal microcrystal pollutants: the heat resistant, transmissible nucleating agents that initiate the pathogenesis of TSEs? Med Hypotheses. 2005;65(3):448-77. DOI: 10.1016/j.mehy.2005.03.018
35. Purdey M. Elevated silver, barium and strontium in antlers, vegetation and soils sourced from CWD cluster areas: Do Ag/Ba/Sr piezoelectric crystals represent the transmissible pathogenic agent in TSEs? Med Hypotheses. 2004;63(2):211-25. DOI: 10.1016/j.mehy.2004.02.041
36. Purdey M. Does an ultra violet photooxidation of the manganese-loaded/copper-depleted prion protein in the retina initiate the pathogenesis of TSE? Med Hypotheses. 2001 Jul;57(1):29-45. DOI: 10.1054/mehy.2001.1305
37. Purdey M. Ecosystems supporting clusters of sporadic TSEs demonstrate excesses of the radical-generating divalent cation manganese and deficiencies of antioxidant co factors Cu, Se, Fe, Zn. Does a foreign cation substitution at prion protein's Cu domain initiate TSE? Med Hypotheses. 2000 Feb;54(2):278-306. DOI: 10.1054/mehy.1999.0836
38. Nikolaenko D. Evolution of infectious ecology. Environmental Epidemiology. 2018;12(2-3):27-46. DOI: 10.13140/RG.2.2.33783.73129 (In Russian).
39. Nikolaenko D. The history of infectious ecology: Mark Purdey. Environmental Epidemiology. 2018;12(4):52-82. DOI: 10.13140/RG.2.2.25226.36802 (In Russian).
40. Tymoshenko A, Korolev A. Mark Purdey and the post-Soviet scientific community: why are scientific innovations so badly perceived? Environmental Epidemiology. 2018;12(4):92-99. DOI: 10.13140/RG.2.2.22110.13123 (In Russian).
41. Tymoshenko A, Korolev A, Bogachevskay E, Kovalenko M. Preliminary results of discussion of the topic "Mark Purdey and the perception of his scientific ideas". Environmental Epidemiology. 2018;12(4):83-91. DOI: 10.13140/RG.2.2.13328.30727 (In Russian).
42. Bogachevskay E, Tymoshenko A. Dynamics of infectious reality and standards of expert reflection (the case of Mark Purdey) Environmental Epidemiology. 2018;12(4):100-10. DOI: 10.13140/RG.2.2.27538.96961 (In Russian).
43. Korolev A, Kovalenko M. Let's say Mark Purdey is still alive... Environmental Epidemiology. 2018;12(4):111-28. DOI: 10.13140/RG.2.2.25226.36802 (In Russian).
44. Rothschild EV. The spatial structure of the natural plague focus and the methods for studying it (using the example of the northern subzone of the Aral-Caspian deserts). Diss. Doctors of Biological Sciences. Saratov. All-Union Research Anti-Plague Institute "Microbe", 1973. (In Russian).
45. Rothschild EV. The spatial structure of the natural focus of the plague and its methods of study. Moscow: "Moscow State University" Publ.; 1978, 192 p. (In Russian).
46. Rusev IT. Ecosystems of the North-Western Black Sea region as the basis for the formation of dangerous faunistic complexes and their structural and functional organization. Thesis for the degree of Doctor of Biological Sciences. Odessa, 2013, 393 p. (In Russian).
47. Rusev IT. DDT pesticide as a provoking factor of activation of the parasitic tularemia ecosystem on Biryuchiy island. Ecosystems, their optimization and protection. 2011;4:144-56. (In Russian).
48. https://www.researchgate.net/profile/Mario_Zunino/publications
49. <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/index.html>
50. Leendertz SA, Gogarten JF, Düb A, Calvignac-Spencer S, Leendertz FH. Assessing the Evidence Supporting Fruit Bats as the Primary Reservoirs for Ebola Viruses. Ecohealth. 2016 Mar;13(1):18-25. DOI: 10.1007/s10393-015-1053-0.
51. Plowright RK, Eby P, Hudson PJ, Smith IL, Westcott D, Bryden WL, et al. Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. Proc Biol Sci. 2015 Jan 7;282(1798):20142124. doi: 10.1098/rspb.2014.2124
52. Paweska JT, Jansen van Vuren P, Fenton KA, Graves K, Grobbelaar AA, Moolla N, et al. Lack of Marburg Virus Transmission From Experimentally Infected to Susceptible In-Contact Egyptian Fruit Bats. J Infect Dis. 2015 Oct 1;212 Suppl 2:S109-18. DOI: 10.1093/infdis/jiv132.
53. Ogawa H, Miyamoto H, Nakayama E, Yoshida R, Nakamura I, Sawa H, et al. Seroepidemiological Prevalence of Multiple Species of Filoviruses in Fruit Bats (Eidolon helvum) Migrating in Africa. J Infect Dis. 2015 Oct 1;212 Suppl 2:S101-8. DOI: 10.1093/infdis/jiv063
54. Hayman DT. Biannual birth pulses allow filoviruses to persist in bat populations. Proc Biol Sci. 2015 Mar 22;282(1803):20142591. DOI: 10.1098/rspb.2014.2591.
55. Mari Saéz A, Weiss S, Nowak K, Lapeyre V, Zimmermann F, Düb A, et al. Investigating the zoonotic origin of the West African Ebola epidemic. EMBO Mol Med. 2015 Jan;7(1):17-23. DOI: 10.15252/emmm.201404792.
56. Genton C, Cristescu R, Gatti S, Levréro F, Bigot E, Motsch P, et al. Using demographic characteristics of populations to detect spatial fragmentation following suspected ebola outbreaks in great apes. Am J Phys Anthropol. 2017 Sep;164(1):3-10. DOI: 10.1002/ajpa.23275.
57. Alexander KA, Sanderson CE, Marathe M, Lewis BL, Rivers CM, Shaman J, et al. What Factors Might Have Led to the Emergence of Ebola in West Africa? PLoS Negl Trop Dis. 2015 Jun 4;9(6):e0003652. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003652
58. Pigott DM, Golding N, Mylne A, Huang Z, Henry AJ, Weiss DJ, et al. Mapping the zoonotic niche of Ebola virus disease in Africa. Elife. 2014 Sep 8;3:e04395. DOI: 10.7554/eLife.04395.
59. Guar, Pascaline & Le Thiec, Sandra & Pierre, Amandine & Genton, Céline & Pierre, Jean-Sébastien & Schaub, Michael & Ménard, Nelly Demography and sociality: Elasticity analysis in a gorilla population affected by an Ebola outbreak. 2015.
60. Genton C, Pierre A, Cristescu R, Lévréro F, Gatti S, Pierre JS, et al. How Ebola impacts social dynamics in gorillas: A multistate modelling approach. J Anim Ecol. 2015 Jan;84(1):166-76. DOI: 10.1111/1365-2656.12268
61. Genton, Céline. (2012). Recovery capabilities of a population of lowland gorillas Western Gorilla (Gorilla gorilla gorilla) following a demographic collapse caused by an Ebola epidemic.
62. Genton C, Cristescu R, Gatti S, Levréro F, Bigot E, Caillaud D, et al. Recovery Potential of a Western Lowland Gorilla Population following a Major Ebola Outbreak: Results from a Ten Year Study. PLoS One. 2012;7(5):e37106. DOI: 10.1371/journal.pone.0037106.
63. Rothschild EV. The ecology of ebola fever in the light of a natural disease model. Trace Elements in Medicine. 2015;16(3):3-11. (In Russian).

64. Nikolaenko D. Glyphosate is the most likely cause of the ebola in Central and West Afric. *Environmental Epidemiology*. 2014;8(1):149-62. (In Russian).
65. Nikolaenko D. Glyphosate and Ebola: Herbicides and Discrete Activation of Pathogens. *Environmental Epidemiology*. 2018;12(2-3):436-45. DOI: 10.13140/RG.2.2.36141.38884. (In Russian).
66. Nikolaenko D. Fundamentals of the adaptation hypothesis of neurodegenerative changes in brain of warm-blooded as a result of transformation of PrPc in PrPSc. *Environmental Epidemiology*. 2018;12(4):4-17. (In Russian).
67. Nikolaenko D. Adaptation hypothesis of neurodegenerative changes in the brain as a result of the transformation of PrPc in PrPSc. *Environmental Epidemiology*. 2018;12(4):18-25.
68. Nikolaenko D. Q-apoptosis and Q-proliferation as the physiological basis of neurodegenerative changes in the brain of warm-blooded animals. *Environmental Epidemiology*. 2017;11(3):40-5. (In Russian).
69. Nikolaenko D. Introduction to the information system "Anthrax in the Russian Empire" (version 1.0). *Environmental Epidemiology*. 2014;8(1):51-112.
70. Nikolaenko D. Anthrax in Russian Empire. First book. *Environmental Epidemiology*. 2013;7(1-2):4-411. (In Russian).
71. Nikolaenko D. Statistics of manifestation of the anthrax in Russian Empire. Part 1. *Environmental Epidemiology*. 2014;8(3):276-449. (In Russian).
72. Nikolaenko D. Paleoepidemiology of infectious diseases as a new scientific direction. *Environmental Epidemiology*. 2018;12(2-3):198-225. DOI: 10.13140/RG.2.2.33921.35686 (In Russian).
73. Paleoepidemiology of anthrax in Russian Empire. Volume 1. Edited by Dmitry Nikolaenko. *Environmental Epidemiology*. 2013;7(3):4-294. (In Russian).
74. Paleoepidemiology of anthrax in Russian Empire. Volume 13. Edited by Dmitry Nikolaenko. *Environmental Epidemiology*. 2017;11(2):3-356. (In Russian).
75. Paleoepidemiology of anthrax in Russian Empire. Volume 14. Edited by Dmitry Nikolaenko. *Environmental Epidemiology*. 2017;11(4):4-205. (In Russian).
76. Adamovich VL Landscape-ecological research in the epidemiology of zoonotic infections. Abstract dis. Dr. Biol. Sciences: 14.00.30. Central Research Institute of Epidemiology, Ministry of Health of the USSR. Moscow, 1983, 27 p. (In Russian).
77. Adamovich VL Landscape-ecological research in the epidemiology of zoonotic infections. Abstract dis. Dr. Biol. Sciences: 14.00.30. Central Research Institute of Epidemiology, Ministry of Health of the USSR. Moscow, 1984, 43 p. (In Russian).
78. Alloisio N, Queiroux C, Fournier P, Pujic P, Normand P, Vallenet D, et al. The Frankia alni Symbiotic Transcriptome. *Mol Plant Microbe Interact*. 2010 May; 23(5):593-607. DOI: 10.1094/MPMI-23-5-0593.
79. Lorena Carro, Tomas Persson, Petar Pujic, Nicole Alloisio, Pascale Fournier, Hasna Boubakri, Katharina Pawlowski, Philippe Normand. Organic acids metabolism in Frankia alni. *Symbiosis*. 2016;70(1-3)37-48. DOI: 10.1007/s13199-016-0404-0
80. Nikolaenko Dmitry. Impact of soil environment, created nitrogen-fixing bacterium Frankia Alni on specific of symbiotic relations between A. castellanii and F. tularensis in Alnus glutinosa forest and dynamic of manifestation pathogens activity by F. Tularensis. April 2018. DOI: 10.13140/RG.2.2.29211.36642
81. Maurin M, Raoult D. Bartonella (Rochalimaea) quintana infections. *Clin Microbiol Rev*. 1996 Jul;9(3):273-92.
82. Myers WF, Wisseman CL Jr, Fiset P, Oaks EV, Smith JF. Taxonomic relationship of vole agent to Rochalimaea quintana. *Infect Immun*. 1979 Dec;26(3):976-83.

Морские травы убивают плохие бактерии

Растения важны в городских условиях для удаления патогенов и улучшения качества воды. Травянистые луга являются наиболее распространенной прибрежной экосистемой на планете. Хотя известно, что эти растения связаны с производством природного биоцида, они не оценивались по их способности удалять микробиологическое загрязнение. Используя амплизонное секвенирование 16S-рибосомного РНК-гена, было обнаружено, что при наличии морских травянистых лугов на 50% уменьшилось относительное количество потенциальных бактериальных патогенов, способных вызвать заболевание у людей и морских организмов. Кроме того, полевые исследования более 8000 коралловых рифовых кораллов, расположенных рядом с травянистыми лугами, показали двукратное снижение уровня заболеваемости по сравнению с кораллами на спаренных участках без смежных лугов. Эти результаты подчеркивают важность экосистемы морских водорослей для здоровья людей и других организмов.



Lamb JB, van de Water JA, Bourne DG, Altier C, Hein MY, Fiorenza EA, et al. Seagrass ecosystems reduce exposure to bacterial pathogens of humans, fishes, and invertebrates. Science. 2017 Feb 17;355(6326):731-733. DOI: 10.1126/science.aal1956

IV научно-практическая конференция с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности»

С 24 по 26 сентября 2018 года в Нижнем Новгороде состоялась IV научно-практическая конференция с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», посвященная 70-летию профессора В.А.Алёшкина. Конференция проходила в одном из конференц-залов «Маринс Парк отеля». Организаторами конференции выступили Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского, Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. И.Н.Блохиной, Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина и Некоммерческое партнерство содействия развитию научных исследований и практического применения бактериофагов «Национальное общество исследователей бактериофагов».

В работе конференции приняли участие 296 делегатов – представители учреждений различного профиля Роспот-

ребнадзора, Минздрава России, Минсельхоза России, Минобрнауки России, Российской академии наук, ФМБА, Минобороны России, Госкорпорации Ростех, частных иммунобиологических и клиничко-диагностических предприятий, а также зарубежные исследователи из Финляндии, США, Германии, Великобритании, Бельгии, Польши, Чехии, Словакии, Австралии, Италии, Испании, Нидерландов, Молдовы и Казахстана.

Конференцию открыла руководитель Роспотребнадзора по Нижегородской области Наталия Сергеевна Кучеренко, огласившая приветствие участников от руководителя Роспотребнадзора – Главного государственного санитарного врача Российской Федерации Анны Юрьевны Поповой. В течение трех дней работы конференции на пленарных и секционных заседаниях было представлено 72 устных и 18 постерных докладов. На пленарной сессии своими достижениями в области исследования бактериофагов и практической возможности фаготерапии поделились известные российские и зарубежные ученые. Большой интерес вызвали пленарные доклады:

Детальная характеристика Интести-фага и Пиофага – шаг в направлении широкого клинического исследования фаготерапии (Е.Kutter – руководитель лаборатории биологии бактериофагов Государственного колледжа Эвергрин, Олимпия, США);

Современные тенденции в изучении механизмов резистентности патогенных микроорганизмов к антибиотикам и разработке технологий получения инновационных средств лечения (И.А.Дятлов – акад. РАН, директор ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия);

Первые клинические результаты индивидуализированной фаготерапии в области сердечно-сосудистой хирургии (д-р Ch.Kühn – отделение кардиоторакальной, трансплантационной и сосудистой хирургии медицинской школы Ганновера, Германия);

Иммунологические аспекты фаготерапии (В.А.Алёшкин – научный руководитель ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского, Москва, Россия);

Вклад Нижегородского НИИЭМ им. академика И.Н.Блохиной в фундаментальные и прикладные исследо-





вания в области создания и применения бактериофагов (Г.И.Григорьева – зам. директора по научной работе ФБУН ННИИЭМ им. акад. И.Н.Блохиной, Нижний Новгород, Россия);

Интересные находки, связанные с иерсиниозными бактериофагами (M.Skurnik – профессор бактериологии университета Хельсинки, Финляндия);

Персонализированная фаготерапия пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (А.С.Шкода – главный врач Городской клинической больницы №67 им. Л.А.Ворохобова, Москва, Россия);

Коротко-циркулирующие бактериофаги (K.Dabrowska – руководитель лаборатории бактериофагов Института иммунологии и экспериментальной терапии, Вроцлав, Польша);

Научно-методический центр по изучению и идентификации бактериофагов: стратегические направления исследований (С.Ю.Комбарова – врио директора ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского, Москва, Россия);

Бактериофаги для модулирования микробиома млекопитающих: «Фагобиотик™ подход» (A.Sulakvelidze – вице-президент Intralytix, Балтимор, США);

Актуальные проблемы и перспективные направления фаготерапии и фагопрофилактики (Ю.А.Захарова – руководитель отдела Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций, Екатеринбург, Россия).

В рамках конференции работало шесть секций по направлениям:

- от классических пробиотиков к зубиотикам, синбиотикам и фагобиотикам;
- антибиотикорезистентность: вчера, сегодня, завтра;
- молекулярные механизмы фаговой инфекции;
- разработка, доклинические и клинические испытания препаратов на основе бактериофагов и их ферментов;
- геномика и протеомика бактериофагов;
- бактериофаг-опосредованный биоконтроль и биопроектирование – новые методы деконтаминации сельскохозяйственных культур, животных и пищевых продуктов

Были организованы два симпозиума: «Производство, качество, клинические исследования и применение лечебно-профилактических препаратов бактериофагов» при поддержке НПО «Микроген» и «Микромиру – мир. Новые подходы к применению бактериофагов в коррекции нарушений биоценоза слизистой оболочки» при поддержке НПЦ «Микромир».





В докладах, представленных на секционных заседаниях, обсуждался широкий круг вопросов, отражающих последние достижения в геномике и протеомике, эволюции и таксономии бактериофагов, в изучении механизмов взаимодействия фагов со своим хозяином – бактериальной клеткой, рассматривались перспективы разработки новых диагностических и лечебно-профилактических препаратов на основе бактериофагов и фаговых белков с литическими и полисахарид-деполимеризующими свойствами. Большое внимание было уделено практическим аспектам применения бактериофагов при лечении инфекционных заболеваний человека, животных и растений. Отдельная секция была посвящена вопросам распространения и перспективам сдерживания антибиотикорезистентности возбудителей бактериальных инфекций.

По материалам докладов, представленных на пленарных и секционных заседаниях, а также по результатам, представленным на стендовой сессии, в кулуарах проходили оживленные дискуссии. На закрытии конференции были отмечены высокий научный и методический уровень большинства докладов, хорошая организация конференции.

Состоявшийся во время работы конференции обмен научной информацией, обсуждение представленных дости-

жений в фундаментальных и прикладных областях исследования бактериофагов, несомненно, будут способствовать расширению наших возможностей по разработке новых средств борьбы с инфекционными заболеваниями и повышению профессиональных знаний участников конференции.

Материалы конференции изданы на русском и английском языках в виде сборника: «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы 4-й научно-практической конференции с международным участием: к 70-летию профессора В.А.Алёшкина», Нижний Новгород, 24–26 сентября / Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека [и др.]. – Москва: Медицинское Маркетинговое Агентство, 2018. – 76 с.

*Н.В.Воложанцев,
заведующий лабораторией молекулярной
диагностики и генно-инженерных препаратов
ФБУН «Государственный научный центр
прикладной микробиологии и биотехнологии»
Роспотребнадзора, к.б.н.*

Форум молодых ученых

В период 24–26 октября в оздоровительном комплексе «Лужки» под Серпуховом проходила X Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора.

Около 80 молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, других ведомств, а также представители Республики Беларусь обсуждали актуальные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены.

Руководитель Роспотребнадзора А.Ю.Попова в приветственном слове в качестве важнейшей задачи определила совершенствование научного сопровождения деятельности по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения, а также выразила надежду, что участники конференции смогут выработать свежие научные идеи и

найти современные подходы к решению значимых для страны задач по охране здоровья населения.

В работе конференции в качестве приглашенных лекторов приняли участие видные ученые: академики Российской академии наук В.Г.Акимкин и И.А.Дятлов, профессора В.А.Алешкин, Т.А.Синицкая и Н.И.Шашина. Председатель Совета молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора А.В.Мелентьев подвел итоги его 10-летний научной деятельности.

В рамках конференции академик РАН, главный редактор журнала «Бактериология» И.А.Дятлов огласил итоги конкурса молодых ученых на лучшую статью по тематике журнала, объявленного в №1 за 2018 год.

I место присуждено статье

Кузнецова Д.А., Подладчикова О.Н. Клонирование и экспрессия генов биосинтеза сидерофора иерсиниачелина *Yersinia pestis* в клетках *Escherichia coli*. Бактериология. 2018; 3(1): 36–44. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-36-44 (ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт»).

II место присуждено статье

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 токсина. Бактериология. 2018; 3(1): 59–62. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-59-62 (ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»).

III место присуждено статье

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 (ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»).



Награждение победителей конкурсов



Участники конференции

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 используют 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