

# БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2018 • том 3 • №4

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](http://www.phdynasty.ru)

Подписано в печать 25.12.2018 г.

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

Природные источники возникновения новых бактериальных патогенов и возможности их выявления. . . . . 5

Гетерогенность генотипов *Helicobacter pylori*, изолированных из различных биотопов, при заболеваниях гепатобилиарной системы

*Г.Ш.Исаева*. . . . . 7

Биологические свойства штаммов *E. coli* серогруппы O144, регистрируемые в Санкт-Петербурге как возбудители острых кишечных инфекций

*М.А.Макарова, Л.А.Кафтырева, З.Н.Матвеева*. . . . . 12

Лиофилизация коллекционных штаммов холерных вибрионов на аппарате коллекторного типа с использованием адсорбентов

*О.С.Чемисова, М.М.Сагакянц, Е.Н.Голенищева, М.В.Полеева, И.В.Морозова*. . . . . 16

Инновационные приемы при бактериологическом исследовании на листериоз

*И.А.Деревянченко, Е.В.Смирнова, Л.А.Краева*. . . . . 21

Молекулярное типирование штаммов *Gardnerella vaginalis*, выделенных у женщин репродуктивного возраста с верифицированным диагнозом бактериального вагиноза

*Т.В.Припутневич, В.В.Муравьева, А.Е.Донников, Д.Ю.Трофимов, Г.Р.Байрамова, Е.А.Межевитинова, Л.А.Любасовская, А.Б.Гордеев, П.Р.Абакарова, Е.С.Шубина, А.Ю.Гольцов*. . . . . 26

Культуральный метод в лабораторной диагностике гнойных бактериальных менингитов

*Л.В.Домотенко, Я.В.Подкопаев, Т.П.Морозова, И.С.Косилова, А.П.Шепелин*. . . . . 33

Питательные среды для выделения дрожжевых и плесневых грибов.

Санитарно-микологический анализ пищевых продуктов

*А.П.Шепелин, О.В.Полосенко, И.И.Марчихина, Л.П.Шолохова*. . . . . 41

Ботулизм: характеристика возбудителя и лабораторные методы его диагностики

*Б.В.Ерусланов, Э.А.Светоч, И.П.Мицевич, Н.К.Фурсова, И.А.Дятлов*. . . . . 47

Опыт использования технологии мономолекулярного нанопорового секвенирования при изучении штаммов бактерий, депонированных в государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск»

*В.И.Соломенцев, А.А.Сизова, Ю.П.Скрябин, А.А.Кисличкина, В.Б.Фролов, Н.В.Майская, С.А.Иванов, С.В.Дентовская, А.П.Анисимов, А.Г.Богун*. . . . . 60

## Пост-релиз

Международная конференция по предотвращению и контролю над заболеваемостью чумой (12–16 ноября 2018 г., г. Харбин, КНР)

*С.В.Балахонов*. . . . . 69

Правила для авторов . . . . . 72

# 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

Natural origins of new bacterial pathogens and the possibility of their identification . . . . .	5
Heterogeneity of genotypes of <i>Helicobacter pylori</i> isolates obtained from different biotopes in diseases of the hepatobiliary system <i>G.Sh.Isaeva</i> . . . . .	7
Biological properties of strains of <i>E. coli</i> serogroup O144, registered in St. Petersburg as causative agents of acute intestinal infections <i>M.A.Makarova, L.A.Kaftyreva, Z.N.Matveeva</i> . . . . .	12
Lyophilization of collection strains of <i>Vibrio cholerae</i> on a collector-type apparatus using adsorbents <i>O.S.Chemisova, M.M.Sagakyants, E.N.Golenischeva, M.V.Poleeva, I.V.Morozova</i> . . . . .	16
Innovative approaches at bacteriological research on listeriosis <i>I.A.Derevyanchenko, E.V.Smirnova, L.A.Krayeva</i> . . . . .	21
Molecular typing of <i>Gardnerella vaginalis</i> strains determined in women of reproductive age with verified diagnosis of bacterial vaginosis <i>T.V.Priputnevich, V.V.Muravyova, A.E.Donnikov, D.Yu.Trofimov, G.R.Bayramova, E.A.Mezhevitinova, L.A.Lyubasovskaya, A.B.Gordeev, P.R.Abakarova, E.S.Shubina, A.Yu.Goltsov</i> . . . . .	26
Cultural method in laboratory diagnostics of purulent bacterial meningitis <i>L.V.Domotenko, Ya.V.Podkopaev, T.P.Morozova, I.S.Kosilova, A.P.Shepelin</i> . . . . .	33
Nutritional media for isolation of yeast and molding mushrooms. Sanitary and mycological analysis of food products <i>A.P.Shepelin, O.V.Polosenko, I.I.Marchikhina, L.P.Sholokhova</i> . . . . .	41
Botulism: characterization of the pathogen and the laboratory diagnostic methods <i>B.V.Eruslanov, E.A.Svetoch, I.P.Mitsevich, N.K.Fursova, I.A.Dyatlov</i> . . . . .	47
Experience of using the technology of monomolecular nanoporic sequence for the study of bacterium strains deposited in the state collection of pathogenic microorganisms and cell cultures "SCPM-Obolensk" <i>V.I.Solomentsev, A.A.Sizova, Yu.P.Scriabin, A.A.Kislichkina, V.B.Frolov, N.V.Mayskaya, S.A.Ivanov, S.V.Dentovskaya, A.P.Anisimov, A.G.Bogun</i> . . . . .	60

---

## Post-release

International conference on plague prevention and control (November 12–16, 2018, Harbin, China) <i>S.V.Balakhonov</i> . . . . .	69
Instructions for Authors . . . . .	72

## Природные источники возникновения новых бактериальных патогенов и возможности их выявления

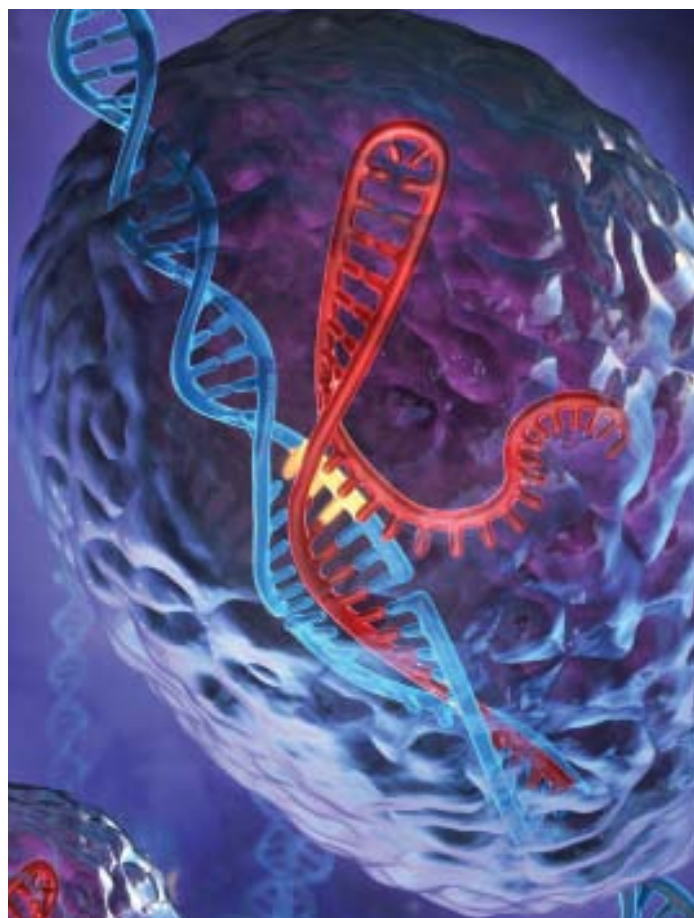
**П**оявление новых патогенных микроорганизмов, в частности бактерий, в большинстве своем населяющих природные экосистемы и существенно превосходящих по биомассе все иные формы жизни на Земле, весьма вероятно по следующим причинам. Во-первых, это изменение климата, приводящее к проявлению «законсервированных» на многие тысячи лет, например в вечной мерзлоте, бактерий, которые могли паразитировать на древних формах жизни – разнообразных ящерах и первичных млекопитающих. Во-вторых, проникновение человека в ранее малодоступные среды – глубины океанов, горные массивы, где могут обитать неизвестные виды эукариотических организмов, имеющие собственные патогены. В-третьих, это крайне малоизученный мир микробов, существующих в глубинных слоях земли (до 5 км) и представляющих собой огромную (по последним данным, до 20 млрд тонн) биомассу бактерий, которые никогда не поднимались на поверхность Земли, имеющих собственный особый метаболизм и стратегию выживания. Кроме того, в какой-то мере следует учитывать и возможное проникновение из космоса патогенов или токсичных соединений, хотя теория панспермии не увязывается с последними исследованиями в области происхождения жизни.

Следует также учитывать, что некультивируемые в искусственных условиях формы бактерий составляют не менее 85% всех микроорганизмов, существующих в природе, и представляют собой так называемую «темную микробиологическую материю», состав и свойства которой только предстоит изучить.

Здесь мы не рассматриваем появление новых патогенов в человеческой популяции и популяциях сельскохозяйственных животных, где может происходить горизонтальный или вертикальный перенос генов вирулентности бактерий, а делаем акцент на возможности появления принципиально новых патогенов.

Исследования вечной мерзлоты на наличие новых видов бактерий и патогенов ведутся достаточно интенсивно, в том числе и нами (недавно выделены два филогенетически древних штаммов сибирской язвы), и этот процесс в достаточной мере контролируется на наличие биологических угроз.

Интенсивное использование недр в различных регионах мира создает риски выявления совершенно новых бактерий, обладающих свойствами, угрожающими человеку. Здесь есть несколько тревожных аспектов. А именно, существуют эукариоты, живущие глубоко под землей (например, нематоды – до 1,5 км), у которых с высокой вероятностью имеются



собственные адаптированные бактериальные паразиты с неизвестными свойствами и возможностями влияния на человека. В огромной массе глубинных бактерий, где происходят, в том числе, процессы конкурирования различных популяций за экологические ниши, могут встречаться виды, способные синтезировать токсичные для человека метаболиты с ферментативными или ингибиторными свойствами. Ярким примером таких молекул является ботулотоксин, вырабатываемый сапрофитным микроорганизмом.

Каковы же сегодняшние возможности для выявления принципиально новых природных патогенов? Стратегия поиска нового патогена первично должна строиться на основании зарегистрированного клинического синдрома. Основные синдромы: синдром острой диареи, синдром острой геморрагической лихорадки, острый желтушный синдром, острый неврологический синдром, острый респираторный синдром, острый дерматологический синдром, острый

офтальмологический синдром, острый «системный» синдром. Для каждого из этих синдромов существует перечень известных, вызывающих их инфекционных болезней и перечень поражающих биотоксинов. Достаточно трудно предположить, что воздействие новых патогенов будет каким-либо иным, поэтому следует положиться на существующую классификацию синдромов.

Выбор и подготовка биологических проб для последующего исследования определяются этими основными клиническими синдромами. Для каждой формы патогенного биологического агента проводится процедура выделения чистой культуры (или биологической структуры) путем посева на питательные среды, культуры клеток, куриные эмбрионы или заражение лабораторных животных. Учитывая, что многие патогены не могут быть культивированы на искусственных средах, необходимо иметь целый спектр разнообразных биомоделей – в основном трансгенных и нокаутных животных, специально созданных для определенного инфекционного заболевания или животных с низким уровнем защищенности от внешних факторов для выявления неизвестного патогена. После выделения культуры, на основе генетических и биохимических свойств, а также по риботипированию с помощью масс-протейной спектрометрии, агент относится к группе известных патогенов по роду и виду или объявляется принципиально новым. Далее определяется наличие факторов вирулентности и лекарственной устойчивости изолята.

В основном все генетические и биохимические признаки факторов вирулентности современных патогенов (бактерий, вирусов, грибов, простейших) известны и хорошо выявляются. Эффективный метагеномный анализ (быстрое массовое параллельное секвенирование всех нуклеиновых кислот в биоматериале и наличие больших вычислительных мощностей) в сочетании с доступом к объемным базам генетических данных позволит достаточно быстро выявить факторы патогенности и предпринять меры к изолированию возбудителя в культуре. Эффективное выделение культуры может быть проведено с применением сортировки клеток, вирусных частиц или отдельных молекул на основе использования меченых узкоспецифичных моноклональных антител с последующим высевом концентрированного материала на среды или заражением биомоделей – животных, культур клеток.

В случае полностью неизвестных патогенов (не несущих известных генетических и биохимических факторов патогенности) необходимо выделение суммарного пула нуклеиновых кислот из образцов пораженных органов, который включает геномы возбудителя и хозяина для последующего метагеномного секвенирования и выявления генома инфекционного агента с помощью биоинформационного анализа. При наличии соответствующих программ и вычислительных мощностей вся процедура обработки данных (вычитание из последовательностей ДНК человека, выравнивание ридов, компрессия дубликатных «прочтений» и др.) вплоть до определения нуклеиновых кислот патогена в базе данных занимает не более часа. Наибольшее значение при этом имеет создание и развитие программ, предсказывающих наличие неизвестного патогена в исследуемом материале.

Современные подходы к предсказанию патогенности основаны на двух основных направлениях: анализе последовательностей, кодирующих белки, и полногеномном анализе. Когда доступны полногеномные последовательности, присутствие/отсутствие генов, кодирующих определенные белки, может быть связано с определенным комплексным фенотипом, например патогенностью. Это утверждение основано прежде всего на наличии факторов вирулентности, которые часто передаются горизонтально, или отсутствию более часто встречаемых генов, которые становятся ненужными при эволюции патогенов из непатогенных предшественников. На сегодняшний день существуют десятки программ, которые работают на этих принципах и отличаются разной степенью достоверности обработки экспериментальных данных. Одной из них является опубликованная в 2016 г. программа PaPrBaG (Pathogenicity Prediction for Bacterial Genomes), предсказывающая патогенность для бактериальных геномов.

Текущие компьютерные программы анализа основаны на поиске сходства последовательностей неизвестного микроба с известными и не обнаруживают новые патогены в тех случаях, когда не с чем сравнивать, т.е. похожие последовательности отсутствуют в базах данных. Подход, используемый в PaPrBaG, основан на обучении компьютерной программы, т.е. программа «обучается» с использованием последовательностей нуклеиновых кислот множества известных патогенных и непатогенных для людей видов бактерий. В результате она приобретает способность предсказывать вероятность патогенных свойств («патогенный потенциал») неизвестного микроорганизма лишь на основании информации о последовательности его нуклеиновых кислот без установления сходства с известными геномами. В основе преимущества PaPrBaG лежит свойство программы работать со всеми последовательностями, в то время как текущие биоинформационные подходы отбрасывают значительную часть последовательностей как «сильно непохожих на известные». Кроме этого, программа надежно работает даже при низком покрытии генома, и ее сочетание с текущими программами повышает эффективность предсказания. С помощью моделирования показано, что программа применима и перспективна в метагеномных исследованиях.

Таким образом, решение проблемы выявления новых бактериальных патогенов в природных источниках лежит в области создания комплексной системы мониторинга за заболеваниями человека неясной этиологии с регистрацией ведущей симптоматики, выявлением подозрительного патогена методами геномного анализа на основе предсказательных биоинформационных программ, его изолирования и всесторонней оценки иммунохимических, биохимических и физиологических свойств.

*И.А.Дятлов*

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

# Гетерогенность генотипов *Helicobacter pylori*, изолированных из различных биотопов, при заболеваниях гепатобилиарной системы

Г.Ш.Исаева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора РФ, Казань, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет», Казань, Российская Федерация

Целью работы было изучить распространенность генотипов *Helicobacter pylori*, изолированных из различных биотопов, при заболеваниях гепатобилиарной системы. С помощью ПЦР-анализа на наличие *H. pylori* было обследовано 11 пациентов с заболеваниями гепатобилиарной системы. По результатам генотипирования изолятов *H. pylori*, выделенных из разных биотопов одних и тех же пациентов, было обнаружено, что полученные генотипы *H. pylori* в разных органах гепатобилиарной системы в отдельных случаях неидентичны. Полученные результаты указывают на то, что в колонизации органов гепатобилиарной системы патогенетическое значение могут иметь штаммы *H. pylori* *Ure C*-положительные, *cagA*, *babA2*-негативные, *vacA*-позитивные, но отличающиеся преобладанием *m2* аллельного варианта, имеющего незначительный уровень токсической активности. Обнаружение различий генотипов *H. pylori*, выделенных из желудка, желчных протоков и печени от больного циррозом печени, может указывать на наличие избирательной колонизации разных биотопов различными подтипами *H. pylori*.

**Ключевые слова:** *Helicobacter pylori*, гепатобилиарная система, генотипы

**Для цитирования:** Исаева Г.Ш. Гетерогенность генотипов *Helicobacter pylori*, изолированных из различных биотопов при заболеваниях гепатобилиарной системы. Бактериология. 2018; 3(4): 7–11. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-7-11

## Heterogeneity of genotypes of *Helicobacter pylori* isolates obtained from different biotopes in diseases of the hepatobiliary system

G.Sh.Isaeva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation;

<sup>2</sup>Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation

The objective of the research was to evaluate the prevalence of genotypes of *Helicobacter pylori* isolates from diverse biotopes in diseases of the hepatobiliary system. Eleven patients with problems of the hepatobiliary system were examined by the PCR analysis for *H. pylori*. Genotyping of *H. pylori* isolates from different biotopes of the same patients showed that obtained *H. pylori* genotypes were non-identical for some organs of the system in some cases. The results indicate that *H. pylori* *C*-positive, *cagA*, *bab2A*-negative, and *vacA*-positive strains, but differing by the predominance of the allelic variant *m2* possessing a negligible level of toxic activity, may be of pathogenetic value in colonization of organs of the hepatobiliary system. Genotype differences of *H. pylori* isolates derived from the stomach, bile ducts and liver of a patient with hepatic cirrhosis can be indicative for the process of selective colonization of different biotopes by different *H. pylori* subtypes.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, hepatobiliary system, genotypes

**For citation:** Isaeva G.Sh. Heterogeneity of genotypes of *Helicobacter pylori* isolates obtained from different biotopes in diseases of the hepatobiliary system. Bacteriology. 2018; 3(4): 7–11. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-7-11

**Ц**ирроз печени является полиэтиологическим заболеванием. В его возникновении наибольшее значение имеют: хроническая инфекция, алкоголизм, недостаток в питании белков и витаминов, токсико-аллергический фак-

тор, нарушения иммунной системы, врожденные генетические дефекты, нарушающие усвоение в организме меди (болезнь Вильсона), железа (гемохроматоз), нарушения обмена веществ с избыточным отложением жира в печени и

### Для корреспонденции:

Исаева Гузель Шавхатовна, доктор медицинских наук, директор ФБУН «Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, заведующая кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет»

Адрес: 420015, Казань, ул. Большая Красная, 67

Телефон: (843) 236-6721

E-mail: kniem@mail.ru

Статья поступила 25.10.2018 г., принята к печати 25.12.2018 г.

### For correspondence:

Guzel Sh. Isaeva, MD, PhD, DSc, director, Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, head of microbiology department of Kazan State Medical University

Address: 67 Bol'shaya Krasnaya str., Kazan, 420015, Russian Federation

Phone: (843) 236-6721

E-mail: kniem@mail.ru

The article was received 25.10.2018, accepted for publication 25.12.2018



индуцированное этим воспаление (так называемый неалкогольный стеатогепатит), длительно существующая сердечная недостаточность и обусловленный ею застой крови в печени, хроническое нарушение оттока желчи из печени (так называемый билиарный цирроз). В печати обсуждается вопрос о патогенетической роли в развитии цирроза некоторых бактерий, обладающих свойством молекулярной мимикрии и способных вызвать перекрестные аутоиммунные реакции (*E. coli*, микобактерии, хламидии, лактобактерии и хеликобактеры) [1]. Ряд работ указывает на возможную кофакторную роль бактерий рода *Helicobacter* в патогенезе цирроза [2–4]. А. Ponzetto и соавт. (2000, 2003) при обследовании больных хроническим активным гепатитом В и С обнаружили антитела к *H. pylori* в 90% и 73% случаев соответственно, тогда как в контроле (сыворотке неинфицированных доноров) – в 47–59% [5, 6]. Сходные результаты были получены S.J. Kontrek и соавт. и P. Stalke и соавт. [7, 8]. Серологические исследования демонстрируют среди больных вирусными гепатитами В и С, инфицированных хеликобактерами, преобладание тяжелых исходов в виде циррозов по сравнению с контрольными группами. R. Pellicano и соавт. среди инфицированных вирусами гепатита С выявили достоверную разницу между частотой обнаружения диагностических титров антител к *H. pylori* в опытной группе (пациенты с циррозом печени) и контрольной (без цирроза) [9]. Работа M. Rocha и соавт. указывает на наличие возможной связи между присутствием в печени ДНК хеликобактеров и развитием цирроза у больных гепатитом С [10]. В 90,5% образцов печени были обнаружены ДНК *H. pylori* и *H. pullorum* подобных видов у больных циррозом и гепатоцеллюлярной карциномой, инфицированных вирусом гепатита С, тогда как у пациентов контрольной группы (инфицированных вирусом гепатита С без цирроза) – только в 3,5% случаях. На основании этих данных можно предположить наличие кофакторной роли бактерий рода *Helicobacter* в развитии тяжелых исходов в течении вирусных гемоконтактных гепатитов и синергизма этой бактериально-вирусной ассоциации. Механизмы такого взаимодействия окончательно не ясны.

**Целью работы** было изучить распространенность генотипов *Helicobacter pylori*, изолированных из различных биотопов, при заболеваниях гепатобилиарной системы.

### Материалы и методы

Выборку группы больных с заболеваниями печени составили 11 больных циррозом печени невыясненной этиологии. Средний возраст больных – 43,2 года. Материалом для исследования в подгруппе циррозов служил архивный аутопсийный материал из тканей печени, желчных протоков, желчного пузыря, желудка. Образцы тканей, зафиксированных в парафине, были использованы для молекулярно-генетического исследования.

Выделение ДНК из парафинизированных образцов производили по методике, предложенной V. Tolia и соавт. [11]. Для этого парафинизированные срезы тканей помещали в пробирки типа Эппендорф, депарафинизировали путем промывания в 1 мл ксилола дважды по 5 минут. Регидратацию проводили трижды в растворах этилового спирта (99%, 95% и 70%), инкубируя 5 минут. После каждого этапа промывки

применяли центрифугирование при 12 000 об/мин в течение 3 минут. Окончательно образец ткани промывали дистиллированной водой в течение 5 минут. Далее выделение ДНК производили сорбционным методом с использованием набора реагентов НПФ Литех «Хеликопол» (Москва). Для этого кусочек ткани помещали в 100 мкл лизирующего буфера, включающего 10 мкл Tris HCl pH 8,8, 25 мМ ЭДТА, 100 мкг/мл протеиназы К, и инкубировали до полного растворения при 56°C около 5 ч. К раствору добавляли 20 мкл водной суспензии сорбента и 500 мкл буфера, состоящего из 10 мМ Tris HCl pH 8,0, 5,5 М гуанидинцианата, 10 мМ ЭДТА. Суспензию инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут, периодически встряхивая, после чего осаждали сорбент центрифугированием на микроцентрифуге CM-50 (ELMI-2, США) в течение 15 с при 12 тыс. об/мин. Супернатант удаляли с помощью вакуумного насоса, а сорбент дважды промывали 70% этанолом и высушивали при 56°C около 15 минут. Для элюции ДНК с сорбента в пробирки добавляли 50 мкл TE-буфера, тщательно перемешивали на вортексе и инкубировали в течение 5 минут при 55°C в термостате. Супернатант отделяли центрифугированием. Полученный раствор, снятый с сорбента, переносили в 0,5 мл пробирку и хранили при –20°C.

Выявление *H. pylori* проводили с помощью ПЦР с использованием специфичных праймеров на нуклеотидную последовательность гена *ureC*. Реакционная смесь содержала 10 мМ Tris HCl pH 8,3, 50 мМ KCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, по 50 мкМ каждого дНТФ, по 10 пкМ каждого праймера (прямой 5'-TCACCCCATGTTTGTTCATCCG-3'; обратный 5'-CACGATCCTTAAACTCTGTAAATT-3'), 1 ед Taq-полимеразы и 5 мкл анализируемого очищенного образца.

Реакцию амплификации проводили в объеме 25 мкл: реакционная смесь – 2,5 мкл, вода деионизованная – 17,5 мкл, Taq-полимераза – 0,2 мкл, образец ДНК – 5 мкл.

Амплификацию проводили в приборе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) по следующей программе:

Температура (°C)	Время	Количество циклов
94°C	1 минута	1 цикл
94°C	30 с	5 циклов
60°C	30 с	
72°C	30 с	
92°C	5 с	40 циклов
50°C	10 с	
72°C	15 с	

По завершении программы продукты амплификации разделяли методом горизонтального электрофореза в агарозном геле в трис-ацетатной буферной системе. Результаты документировали с помощью видеосистемы для регистрации гелей DNA Analyzer (НПФ «Литех», Россия). Наличие полосы длиной 492 п.н.о. свидетельствовало о присутствии в пробе ДНК *H. pylori*.

Такие образцы использовали для дальнейшего генотипирования *H. pylori*. Для генотипирования штаммов *H. pylori* в отношении *cagA* использовали набор реагентов «Хеликопол СА» НПФ «Литех» (Москва).

Реакцию амплификации проводили в 30 мкл реакционной смеси: вода деионизованная – 14,3 мкл, ПЦР-буфер – 3 мкл,

раствор dNTP – 3 мкл, MgCl<sub>2</sub> – 2,5 мкл, праймер – 2 мкл, Taq-полимераза – 0,2 мкл, ДНК пробы – 5 мкл.

В качестве положительного контроля использовали нативную ДНК *H. pylori* генотипа *cagA*. Размер полосы в положительной пробе при электрофорезе был равен 404 п.н.о.

Генотипирование проводили при следующем температурном режиме:

Температура (°C)	Время	Количество циклов
94°C	1 минута	1 цикл
94°C	1 минута	35 циклов
52°C	1 минута	
72°C	2 минуты	
72°C	5 минут	1 цикл

Разделение продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле в присутствии бромистого этидия в 1x TAE буфере.

**Генотипирование в отношении гена *vacA*.** Для генотипирования штаммов *H. pylori* в отношении *vacA* использовали набор реагентов «Хеликопол VA» НПФ «Литех» (Москва).

Реакцию амплификации проводили в 30 мкл реакционной смеси: вода деионизованная – 14,3 мкл, ПЦР-буфер – 3 мкл, dNTP – 3 мкл, MgCl<sub>2</sub> – 2,5 мкл, праймер – 2 мкл, Taq-полимераза – 0,2 мкл, ДНК пробы – 5 мкл.

Генотипирование проводили при следующем температурном режиме:

Температура (°C)	Время	Количество циклов
94°C	1 минута	1 цикл
94°C	1 минута	35 циклов
52°C	1 минута	
72°C	2 минуты	
72°C	5 минут	1 цикл

Размеры полос в положительных пробах при электрофорезе были следующими: *vacAs1* – 259 п.н.о., *vacAs2* – 286 п.н.о., *vacAm1* – 290 п.н.о., *vacAm2* – 352 п.н.о.

Для генотипирования изолятов *H. pylori* в отношении *babA* использовали набор реагентов «Хеликопол ВА» НПФ «Литех» (Москва). Реакцию амплификации проводили в 30 мкл реакционной смеси: вода деионизованная – 14,3 мкл, ПЦР-буфер – 3 мкл, dNTP – 3 мкл, MgCl<sub>2</sub> – 2,5 мкл, праймер – 2 мкл, Taq-полимераза – 0,2 мкл, ДНК пробы – 5 мкл.

В качестве положительного контроля была использована плаزمиды с вставкой ДНК генотипа *babA H. pylori* размером 800 п.н.о.

Генотипирование проводили при следующем температурном режиме:

Температура (°C)	Время	Количество циклов
94°C	1 минута	1 цикл
94°C	1 минута	35 циклов
52°C	1 минута	
72°C	2 минуты	
72°C	5 минут	1 цикл

Разделение продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле в присутствии бромистого этидия в 1x TAE буфере.

## Результаты и обсуждение

Было проведено сравнительное изучение генотипов изолятов *H. pylori*, выделенных из разных биотопов одних и тех же пациентов. Результаты представлены в таблице. По данным генотипирования было обнаружено, что полученные генотипы *H. pylori* в разных органах гепатобилиарной системы в отдельных случаях неидентичны. Так, у пациента №2 генотип *H. pylori*, детектируемый в желчном протоке (*cagA + vacAs1/m2*), отличается от такового в образцах печени (*cagA + vacAs2*); у пациента №6 результат ПЦР, полученный в желудке (*cagA + vacAm2*), не подтвердился ни в печени, ни в желчном пузыре (*cagA-vacAm2*); *cagAvacAs1/s2*-положительный генотип был обнаружен в биоптате желудка пациента №7, а из печени был выделен *cagA*-негативный изолят.

Подобные несоответствия генотипов, обнаруженные также и у других больных, могут быть объяснены инфицированием больного бактериями с различными генотипами. Явление специфичной колонизации гепатобилиарного тракта штаммами хеликобактеров, отличных от таковых, колонизирующих желудок или двенадцатиперстную кишку, возможно, объясняется наличием определенных рецепторов в тканях гепатобилиарной системы и условий, в которых определенные штаммы оказываются более успешными, а другие элиминируются под действием этих же условий. Другое возможное объяснение может быть связано с тем, что на начальном этапе инфицирования потеря «островка патогенности» *cagA* штаммами *H. pylori* может стать полезной ввиду его высокой иммуногенности, тем самым способствовать задержке таких бактерий в гепатобилиарном тракте. Возможно, этим можно объяснить, что в исследуемой нами группе больных более половины пациентов являются носителями *cagA*-отрицательных штаммов *H. pylori*.

Известно, что на процесс формирования различных исходов *H. pylori* инфекции могут оказывать влияние как эндогенные факторы макроорганизма (генетические особенности человека, иммунный статус и т.д.), так и экзогенные, в том числе и факторы окружающей среды (социально-

Таблица. Встречаемость различных генотипов *H. pylori* в зависимости от биотопа

№	Образцы	<i>H. pylori</i>	Генотипы <i>H. pylori</i>
1	ж. проток	+	<i>vacAs1/m2babA2</i>
	желудок	+	<i>vacAm2babA-</i>
2	ж. проток	+	<i>cagA+vacAs1/m2</i>
	желудок	+	<i>cagA+vacAs2</i>
3	ж. проток	+	<i>cagA+vacAs1m2</i>
	печень	+	<i>cagA+vacAs2m2</i>
4	ж. проток	+	<i>cagA-vacAm2</i>
	печень	+	<i>cagA-vacAm2</i>
5	ж. пузырь	+	<i>cagA-vacAm2</i>
	желудок	+	<i>cagA+vacAm2</i>
	печень	+	<i>cagA-vacAm2</i>
6	ж. пузырь	+	<i>cagA-vacAm2</i>
	желудок	+	<i>cagA+vacAm2</i>
7	печень	+	<i>cagA-vacAs1/s2</i>
	ж. проток	-	-
8	желудок	+	<i>cagA+vacAs1/s2</i>
	Печень	+	<i>cagA-vacAs2</i>
	желудок	+	<i>cagA+vacAs1</i>

экономические условия, характер питания и т.д.). На характер течения заболевания может оказывать влияние и генотип микроорганизма.

Штаммы *H. pylori* разделены на два генотипа: тип I – имеющие *cagA* и экспрессирующие *CagA* и *VacA* цитотоксины и тип II – не экспрессирующие их. С определенным генотипом может быть связана колонизирующая способность различных штаммов *H. pylori*. Так, установлено, что *CagA*-негативные штаммы обычно колонизируют слизистый слой и верхушки эпителиальных клеток, а *CagA*-позитивные расположены вблизи эпителиальных клеток или в межклеточном пространстве [12]. Возможно, в колонизации органов гепатобилиарной системы принимают участие штаммы *H. pylori*, имеющие генотип, отличный от штаммов, колонизирующих желудочный эпителий. По данным P.Avenaud и соавт., бактерии I типа превалируют над II типом при изучении геномов *H. pylori*, выделенных из ткани печени [13]. E.Apostolov и соавт. демонстрировали присутствие цитотоксинов *CagA* и *VacA* в эпителиальных клетках желчного пузыря при хроническом воспалении [14], но P.Stalke и соавт. наряду с высокой частотой детекции *H. pylori* в печени и желудке с использованием иммуногистохимических и молекулярных методов *CagA* штаммы в печени выявляли значительно реже, чем в желудке, и предположили возможную роль *cagA*-негативных штаммов в развитии заболеваний печени [8]. Сходные данные были получены T.Pirouz и соавт., которые обнаружили ДНК *H. pylori* в 17 образцах печени 46 больных, при этом все изоляты *H. pylori* были *cagA*-негативными [15].

В нашем исследовании сравнение генотипов изолятов *H. pylori*, выделенных из различных биотопов желудочно-кишечного тракта больных с заболеваниями гепатобилиарной системы, показало их принадлежность ко всем основным генотипам: I, Ia, Ib, III. Но, несмотря на преобладание в слизистой оболочке желудка штаммов *H. pylori* с I генотипом, чаще из ткани печени, желчных протоков выделяли *cagA*-отрицательные изоляты. Полученные данные могут указывать на избирательную колонизацию гепатобилиарной системы *cagA*-негативными вариантами.

В нашем исследовании ДНК *H. pylori* в образцах печени, желчного пузыря и желчного протока была обнаружена у 8 из 11 пациентов с циррозом печени. Высокая частота обнаружения *H. pylori* в органах гепатобилиарной системы больных циррозом печени сочеталась с высокой частотой выявления этого микроорганизма в слизистой оболочке желудка. Патогенетическим механизмом повреждающего действия *H. pylori* на гепатоциты может служить аутоиммунное повреждение клеток печени, при котором антитела к *H. pylori* из-за антигенной «мимикрии» микроорганизма способны вступать во взаимодействие с клетками эпителия желчных канальцев или гепатоцитами. На патогенетическую роль *H. pylori* в патогенезе цирроза печени указывают экспериментальные работы *in vitro* и *in vivo*. K.Ito и соавт. провели заражение клеточной культуры гепатоцитов взвесью *H. pylori*, содержащей  $10^7$  микробных клеток, для изучения персистирующей способности этого микроорганизма [16]. Они установили, что большая часть инокулята адгезировалась на гепатоцитах, приблизительно 2% бактерий проникли внутрь и персистировали внутриклеточно на

протяжении нескольких пассажей более 2 мес. Эти результаты были подтверждены электронной микроскопией. Количество адгезировавших и инвазированных в гепатоциты хеликобактеров было выше, чем в эпителиальные клетки слизистой оболочки желудка с достоверностью  $p < 0,05$ , и зависело от *cag*-PAI-статуса, преимущественно от присутствия генов «островка патогенности» *babA*, *oipA*, *vacA*. Процесс адгезии бактерий к гепатоцитам был ингибирован антителами к  $\beta$ -1-интегрину – поверхностному рецептору *H. pylori*. На основании полученных результатов был сделан вывод, что *H. pylori* адгезирует на гепатоцитах, инвазирует их и персистирует внутриклеточно на протяжении длительного времени. Процесс адгезии и инвазии находится в зависимости от факторов патогенности и наличия рецептора  $\beta$ -1-интегрин. Эти опыты указывают на потенциальную способность *H. pylori* вызывать патологические изменения ткани печени. Эта же исследовательская группа обнаружила, что *H. pylori* вызывает нарушения апоптоза и синтез ДНК в гепатоцитах, причем эти изменения в зараженных клетках зависят от вирулентности *H. pylori*: различия цитопатических эффектов, вызываемых вирулентными и менее вирулентными штаммами *H. pylori*, были существенными [17]. Сходные результаты были получены другой исследовательской группой под руководством D.-F.Chen и соавт., которые при изучении воздействия штаммов *H. pylori*, выделенных из желчного пузыря, на первичные культуры эпителиальных клеток желчного пузыря человека обнаружили выраженное цитопатическое действие в виде изменения морфологии клеток, уменьшения их размеров, вакуолизации цитоплазмы, уменьшения ядра, агрегации хроматина, в дальнейшем на 3–4-й день культивирования наблюдали разрыв клеток и их гибель [18]. В контроле жизнеспособность клеток уменьшалась на 7-й день, а гибель клеточной культуры произошла на 14-й день. Измерение активности клеточных ферментов показало повышение их уровня в культуральной жидкости при внесении микробной взвеси *H. pylori* и ультразвуковых фильтратов в различных разведениях, свидетельствующее о повреждении клеточных мембран эпителиальных клеток желчного пузыря и «утечке» энзимов. Хотя при заражении клеточных культур ультразвуковыми фильтратами повреждающий эффект был слабее, а повышение уровня ферментов незначительным по сравнению с заражением супернатантами *H. pylori*. Это может быть связано с тем, что липополисахарид клеточной стенки (основной токсин, образующийся при гибели *H. pylori* в ультразвуковых фильтратах) имеет менее выраженный токсический эффект, чем цитотоксины *CagA* и *VacA*, выделяемые *H. pylori* прижизненно. На основании полученных результатов *in vitro* был сделан вывод, что *H. pylori* способен повреждать эпителий желчного пузыря и вызывать холецистит. Результаты исследований *in vitro* коррелируют с результатами, проведенными *in vivo*. Группа исследователей под руководством X.F.Tian пришли к выводу, что эти бактерии способны колонизировать печень, вызывать хроническое воспаление, цирроз, гепатоцеллюлярную карциному, действуя как независимый этиологический фактор. Это заключение было сделано на основании двухлетнего наблюдения за мышами линии C57BL/6, зараженными перорально штаммом SS1 *H. pylori*. У 12 из 20 зара-

женных мышей обнаружение *H. pylori* в желудке сочеталось с патологическими изменениями, включая один случай лимфомы. У 7 из них в печени было выявлено *H. pylori*-инфицирование, ассоциированное с поражениями печеночной ткани в виде воспаления, фиброза, гиперплазии и атипии. Результаты секвенирования обнаруженных в печени и желудке изолятов показали 100% гомологию со штаммом SS1. В группе мышей, у которых *H. pylori* отсутствовал в желудке, также он не был выявлен в печени, патологические изменения также отсутствовали. На основании полученных результатов было сделано заключение, что *H. pylori*, колонизируя слизистую оболочку желудка, далее колонизирует гепатобилиарную систему, вызывая повреждения в виде воспаления, фиброза, гиперплазии и атипии. Но не у всех инфицирование одним штаммом *H. pylori* заканчивается колонизацией, вероятно, процессы адгезии, колонизации, инвазии, персистенции зависят от ряда других факторов экзогенного и эндогенного характера [19].

### Заключение

Полученные результаты указывают на то, что в колонизации органов гепатобилиарной системы патогенетическое значение могут иметь штаммы *H. pylori* Ure C-положительные, *cagA*, *babA2*-негативные, *vacA*-позитивные, но отличающиеся преобладанием m2 аллельного варианта, имеющего незначительный уровень токсической активности. Обнаружение различий генотипов *H. pylori*, выделенных из желудка, желчных протоков и печени от больного циррозом печени, может указывать на наличие избирательной колонизации разных биотопов различными подтипами *H. pylori*.

### Литература/References

1. Bogdanos DP, Vergani D. Bacteria and primary biliary cirrhosis. Clin Rev Allergy Immunol. 2009 Feb;36(1):30-9. DOI: 10.1007/s12016-008-8087-9.
2. Pellicano R, Menard A, Rizzetto M, Megraud F. *Helicobacter species* and liver diseases: association or causation? Lancet Infect Dis. 2008 Apr;8(4):254-60. DOI: 10.1016/S1473-3099(08)70066-5.
3. Pellicano R. *Helicobacter pylori* among patients with cirrhosis: incidence or prevalence? Eur J Gastroenterol Hepatol. 2017 Nov;29(11):1315. DOI: 10.1097/MEG.0000000000000978.
4. Pogorzelska J, Łapińska M, Kalinowska A, Łapiński TW, Flisiak R. *Helicobacter pylori* infection among patients with liver cirrhosis. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2017 Oct;29(10):1161-1165. DOI: 10.1097/MEG.0000000000000928.
5. Ponzetto A, Pellicano R, Leone N, Berrutti M, Turrini F, Rizzetto M. *Helicobacter pylori* seroprevalence in cirrhotic patients with hepatitis B virus infection. Neth J Med. 2000 Jun;56(6):206-10.
6. Ponzetto A, Pellicano R, Pedaelli A, Rizzetto M, Roffi L. *Helicobacter pylori* infection in patients with hepatitis C virus positive chronic liver diseases. New Microbiol. 2003 Oct;26(4):321-8.
7. Konturek SJ, Gonciarz M, Gonciarz Z, Bielanski W, Mazur W, Mularczyk A, et al. Progastrin and its products from patients with chronic viral hepatitis and liver cirrhosis. Scand J Gastroenterol. 2003 Jun;38(6):643-7.
8. Stalke P, Abu Al-Soud W, Bielawski KP, Bakowska A, Trocha H, Stepinski J, Wadström T. Detection of *Helicobacter* species in liver and stomach tissues of patients with chronic liver diseases using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis and immunohistochemistry. Scand J Gastroenterol. 2005 Sep;40(9):1032-41. DOI: 10.1080/00365520510023251
9. Pellicano R, Leone N, Berrutti M, Cutufia MA, Fiorentino M, Rizzetto M, Ponzetto A. *Helicobacter pylori* seroprevalence in hepatitis C virus positive patients with cirrhosis. J Hepatol. 2000 Oct;33(4):648-50.
10. Rocha M, Avenaud P, Ménard A, Le Bail B, Balabaud C, Bioulac-Sage P, et al. Association of *Helicobacter* species with hepatitis C cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma. Gut. 2005 Mar;54(3):396-401. DOI: 10.1136/gut.2004.042168
11. Tolia V, Nilsson HO, Boyer K, Wuerth A, Al-Soud WA, Rabah R, Wadström T. Detection of *Helicobacter ganmani*-like 16S rDNA in pediatric liver tissue. *Helicobacter*. 2004 Oct;9(5):460-8. DOI: 10.1111/j.1083-4389.2004.00266.x
12. Camorlinga-Ponce M, Romo C, González-Valencia G, Muñoz O, Torres J. Topographical localisation of *cagA* positive and *cagA* negative *Helicobacter pylori* strains in the gastric mucosa; an in situ hybridisation study. J Clin Pathol. 2004 Aug; 57(8):822-8. DOI: 10.1136/jcp.2004.017087
13. Avenaud P, Marais A, Monteiro L, Le Bail B, Bioulac Sage P, Balabaud C, Mégraud F. Detection of *Helicobacter species* in the liver of patients with and without primary liver carcinoma. Cancer. 2000 Oct 1;89(7):1431-9.
14. Apostolov E, Al-Soud WA, Nilsson I, Kornilovska I, Usenko V, Lyzogubov V, et al. *Helicobacter pylori* and other *Helicobacter* species in gallbladder and liver of patients with chronic cholecystitis detected by immunological and molecular methods. Scand J Gastroenterol. 2005 Jan;40(1):96-102.
15. Pirouz T, Zounubi L, Keivani H, Rakhshani N, Hormazdi M. Detection of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded specimens from patients with chronic liver diseases using the amplification method. Dig Dis Sci. 2009 Jul;54(7):1456-9. DOI: 10.1007/s10620-008-0522-5
16. Ito K, Yamaoka Y, Ota H, El-Zimaity H, Graham DY. Adherence, internalization, and persistence of *Helicobacter pylori* in hepatocytes. Dig Dis Sci. 2008 Sep;53(9): 2541-9. DOI: 10.1007/s10620-007-0164-z
17. Ito K, Yamaoka Y, Yoffe B, Graham DY. Disturbance of apoptosis and DNA synthesis by *Helicobacter pylori* infection of hepatocytes. Dig Dis Sci. 2008 Sep;53(9):2532-40. DOI: 10.1007/s10620-007-0163-0.
18. Chen DF, Hu L, Yi P, Liu WW, Fang DC, Cao H. *Helicobacter pylori* damages human gallbladder epithelial cells *in vitro*. World J Gastroenterol. 2008 Dec 7;14(45): 6924-8.
19. Tian XF, Fan XG, Huang X, Fu CY, Dai H, Huang Y. A two-year animal experimental study on the pathological effects of *Helicobacter pylori* on liver tissues. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi. 2008 Feb;16(2):129-33.

# Биологические свойства штаммов *E. coli* серогруппы O144, регистрируемые в Санкт-Петербурге как возбудители острых кишечных инфекций

М.А.Макарова<sup>1,2</sup>, Л.А.Кафтырева<sup>1,2</sup>, З.Н.Матвеева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова», Санкт-Петербург, Российская Федерация

В Российской Федерации на фоне улучшения лабораторной диагностики эшерихиозов сохраняется проблема переоценки роли некоторых серологических групп *E. coli* в этиологии острых кишечных инфекций (ОКИ). К одной из них относятся *E. coli* серогруппы O144. Изучены 259 штаммов *E. coli* O144, выделенных из испражнений людей, обследованных с профилактической целью в бактериологических лабораториях Санкт-Петербурга в 2012–2017 гг. По культурально-ферментативным свойствам изученные штаммы относились к «новому», не описанному ранее биовару 4. Методом SerotypeFinder у штаммов этого биовара был установлен серологический вариант *E. coli* O144:H45. Молекулярно-генетическими методами было установлено, что циркулирующие в Санкт-Петербурге штаммы *E. coli* O144:H45 не содержат гены, кодирующие факторы патогенности, характерные для *Shigella spp.* и энтероинвазивных *E. coli* (EIEC): плазмидные (*ipaH*) и хромосомные (*ial*) гены инвазивности. У штаммов не выявлены другие гены, наличие которых характерно для других патогрупп диареогенных *E. coli*, кодирующие адгезию (*eae*, *bfp*, *aaf*), продукцию шигаподобных токсинов (*stx1*, *stx2*) и энтеротоксинов (*lt*, *st*). Отсутствие генов, контролирующих основные факторы вирулентности, характерные для EIEC и других диареогенных *E. coli*, не позволяет признать такие штаммы возбудителями ОКИ у людей.

**Ключевые слова:** диареогенные *E. coli*, серогруппа O144, серотипирование, инвазивность, факторы вирулентности

**Для цитирования:** Макарова М.А., Кафтырева Л.А., Матвеева З.Н. Биологические свойства штаммов *E. coli* серогруппы O144, регистрируемых в Санкт-Петербурге как возбудители острых кишечных инфекций. Бактериология. 2018; 3(4): 12–15. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-12-15

## Biological properties of strains of *E. coli* serogroup O144, registered in St. Petersburg as causative agents of acute intestinal infections

М.А.Makarova<sup>1,2</sup>, L.A.Kaftyreva<sup>1,2</sup>, Z.N.Matveeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

<sup>2</sup>North-Western State Medical University named after I.I.Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation

In the Russian Federation, against the background of improved laboratory diagnosis of *Escherichia coli*, the problem of reevaluation of the role of some serological groups of *E. coli* in the etiology of acute intestinal infections remains. One of them are *E. coli* serogroup O144. 259 strains *E. coli* O144 isolated from feces of people surveyed prophylactic in the bacteriological laboratories of Saint Petersburg in period of 2012–2017 was studied. On cultural and fermentative properties, the studied strains belonged to the "new", previously undescribed biovar 4. Method SerotypeFinder the strains of this biovar was established serological variant of *E. coli* O144:H45. It was established by molecular genetic methods that circulating strains of *E. coli* O144:H45 in St. Petersburg do not have genes encoding pathogenicity factors characteristic of *Shigella spp.* and enteroinvasive *E. coli* (EIEC): plasmid (*ipaH*) and chromosomal (*ial*) invasive genes. Of strains revealed no other genes, the presence of which is characteristic for other pathgroup diarrheagenic *E. coli*, encoding the adhesion (*eae*, *bfp*, *aaf*), products Shiga toxins (*stx1*, *stx2*) and enterotoxins (*lt*, *st*). The absence of genes that control the main virulence factors, characteristic of EIEC and other diarrheagenic *E. coli*, does not allow to recognize such strains as pathogens in humans.

**Keywords:** diarrheagenic *E. coli*, serogroup O144, serotyping, invasive, virulence factors

**For citation:** Makarova M.A., Kaftyreva L.A., Matveeva Z.N. Biological properties of strains of *E. coli* serogroup O144, registered in St. Petersburg as causative agents of acute intestinal infections. Bacteriology. 2018; 3(4): 12–15. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-12-15

### Для корреспонденции:

Макарова Мария Александровна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории идентификации патогенов ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», ассистент кафедры медицинской микробиологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова»

Адрес: 197111, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14

Телефон: (812) 232-4883

E-mail: makmaria@mail.ru

Статья поступила 30.10.2018 г., принята к печати 25.12.2018 г.

### For correspondence:

Maria A. Makarova, MD, PhD, senior researcher of the laboratory of pathogen identification, Saint-Petersburg Pasteur Institute, assistant of the department of medical microbiology, North-Western State Medical University named after I.I.Mechnikov

Address: 14 Mira str., St. Petersburg, 197111, Russian Federation

Phone: (812) 232-4883

E-mail: makmaria@mail.ru

The article was received 30.10.2018, accepted for publication 25.12.2018

**В** последние шесть лет рост показателей заболеваемости эшерихиозами в Российской Федерации явился следствием улучшения лабораторной диагностики данной группы инфекций, что связано с активным развитием и внедрением молекулярно-генетических методов исследования [1]. Тем не менее сохраняется актуальность проблемы переоценки роли некоторых серологических вариантов *E. coli* в этиологии ОКИ, отражающая недостаточную эффективность применения современного спектра методов этиологической диагностики в бактериологических лабораториях медицинских организаций. Согласно МУ 04-723/3 по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями, штаммы *E. coli* O144 относятся к группе энтероинвазивных *E. coli* (EIEC), способных вызывать дизентериеподобные заболевания [2]. Штаммы *E. coli* этой патогруппы характеризуются способностью к эпителиальной инвазии, которая подтверждается в тесте Шереня – способности вызывать кератоконъюнктивит (КК) у морских свинок [2–4]. В Российской Федерации в 1990–2000 гг. официально было зарегистрировано 15 вспышек эшерихиозов, обусловленных EIEC, принадлежавших к серогруппам O124, O144 и O164, с числом случаев от 19 до 760 [5]. Эти вспышки не имели определенной территориальной привязанности, сезонность их возникновения не была выражена. Большинство вспышек было расценено как пищевые, в ходе которых факторами передачи служили разнообразные продукты питания как животного, так и растительного происхождения. Изолированные во время вспышек штаммы *E. coli* были серотипированы по O-антигену и более детально (определение серологического варианта, факторов/генов вирулентности и других свойств) не изучались.

Штаммы EIEC O144 впервые были выделены в 1956 г. в Японии во время вспышки «дизентериеподобных» заболеваний среди школьников [3, 6]. В 1967 г. японские микробиологи показали, что популяция *E. coli* O144 неоднородна по значительному числу ферментативных и морфологических свойств. Среди них встречались неподвижные (HNM) и подвижные варианты с H антигенами 4, 18 и 25, аэрогенные и анаэрогенные, индолобразующие и индолотрицательные, ферментирующие и не ферментирующие рамнозу и сорбит. Отмечено, что штаммы *E. coli* O144:H4 не вызывали КК (давали отрицательный результат в пробе Шереня), в отличие от HNM и штаммов с H антигенами 18 и 25. В России впервые штаммы *E. coli* O144 были выделены в 1968 г. от пациентки с диагнозом «острая дизентерия» [7]. В 1975 г. Б.С.Киселевой была предложена схема разделения штаммов *E. coli* O144 на биовары по ферментативным свойствам с учетом серотиповой принадлежности и результатов пробы Шереня [3, 6]. В нашей стране по настоящее время схема биотипирования в клинико-диагностических лабораториях используется только с учетом ферментативных свойств штаммов.

Несмотря на то что этиологическая роль обсуждаемых возбудителей EIEC O144 общепризнана [8], отсутствие способности к инвазии некоторых серовариантов продолжает служить предметом дискуссии и требует детального комплексного изучения биологических свойств штаммов, выделенных от пациентов с диарейными заболеваниями или от здоровых лиц, обследованных с профилактической целью.

**Цель исследования.** Изучить биологические свойства, серотиповую принадлежность и генетические детерминанты факторов вирулентности штаммов *E. coli* O144, регистрируемых в Санкт-Петербурге как возбудители острых кишечных инфекций.

## Материалы и методы

Изучены 259 штаммов *E. coli* O144, выделенных из испражнений людей, обследованных с профилактической целью в бактериологических лабораториях Санкт-Петербурга в 2012–2017 гг. Ферментативные свойства и O-групповая принадлежность были определены общепринятыми методами. Чувствительность к 14 антимикробным препаратам (АМП): ампициллину, амоксиклаву, цефотаксиму, цефтазидиму, меропенему, гентамицину, тобрамицину, амикацину, тетрациклину, хлорамфениколу, налидиксовой кислоте, цiproфлоксацину, нитрофурантоину, ко-тримоксазолу изучали диско-диффузионным методом, используя критерии интерпретации, приведенные в клинических рекомендациях «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» с диагностическими дисками Oxoid (Великобритания) [9].

Подготовку геномных библиотек для полногеномного секвенирования проводили путем синтеза с обратным терминированием Illumina (США), согласно инструкции производителя. Секвенирование геномов проводили с помощью секвенатора Miseq. Оценку качества ридов проводили с помощью программы FastQC.

Для установления серотиповой принадлежности штаммов полученные нуклеотидные последовательности были анализированы с использованием веб-базы SerotypeFinder (<http://www.genomicpidemiology.org>).

Маркеры вирулентности выявляли ПЦР с наборами специфических праймеров к 14 генам патогенности, кодирующим способность к адгезии (*pap*, *aaf*, *sfa*, *afa*, *eaeA*, *bfpA*), инвазии (*ipaH*, *ial*) и токсинообразованию (*hly*, *cnf*, *stx1*, *stx2*, *lt*, *st*) [10, 11]. ДНК для детекции маркеров патогенности выделяли с помощью набора InstaGeneMatrix, Bio-Rad (США). При постановке ПЦР использовали праймеры, синтезируемые ЗАО «Евроген» (Россия). ПЦР проводили в реакционной смеси MasterMix объемом 25 мкл в амплификаторе C1000 ThermalCycler, Bio-Rad (США). Продукты амплификации анализировали путем электрофоретического разделения в горизонтальном 2% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. В качестве маркеров молекулярного веса использовали GeneRuler 100 bp DNA Ladder Fermentas (Литва). В качестве положительных контролей служили штаммы энтеробактерий: *E. coli* 10-407 (*lt*, *st*), *E. coli* 217 (*bfpA*, *eaeA*), *E. coli* EDL933 (*stx1*, *stx2*, *hly*), *E. coli* KS52 (*afa*), *E. coli* J96 (*pap*, *sfa*, *cnf*), *E. coli* 17-2 (*aaf*); *S. flexneri* 98-11741 (*ipaH*, *ial*). Отрицательными контролями служили штаммы *Hafnia* (*aaf*) и *E. coli* Hb101 для других перечисленных генов.

## Результаты и обсуждение

Этиологическая особенность эшерихиозов в Санкт-Петербурге заключалась в периодическом преобладании *E. coli* O144, на долю которых приходилось 25% всех выделенных культур. Эпидемиологическая особенность

Таблица 1. Ферментативные свойства биоваров *E. coli* O144

Биовар	Серовар	Подвижность	Ферментация					
			глюкоза (газ)	лактоза	дульцит	сорбит	салицин	лизин
1	O144:K:H-	-	-	(+)	-	-	-	-
2	O144:K:H4	+	+	+	-	+, (+)	(+)	+
3	O144:K:H18	+	+	-	(+)	(+)	-, (+)	-
	O144:K:H25	+	+	-	(+)	(+)	-, (+)	-
4	O144:K:H45	-	+	(+)	-	+	-	+

«+» – подвижный или ферментирующий субстрат в течение 24 ч штамм;  
«-» – неподвижный или не ферментирующий субстрат штамм;  
(+) – замедленная ферментация субстрата на 2–10-е сутки.

Таблица 2. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *E. coli* O144:H45 (n = 259)

Признак (ген)	O144: H45 (биовар 4)	
Инвазины	Ген инвазивности ( <i>ipaH</i> )	-
	Ген инвазивности ( <i>ial</i> )	-
	Кератокоњунктивит у морской свинки	-
Адгезины	P-пили ( <i>pap</i> )	-
	S-фимбрии ( <i>sfa</i> )	-
	Афимбриальные адгезины ( <i>afa</i> )	-
	Интимин ( <i>eae</i> )	-
	Агрегативно-адгезивные фимбрии ( <i>aaf</i> )	-
Токсины	α-Гемолизин ( <i>hly</i> )	-
	Цитонекротический фактор ( <i>cnf</i> )	-
	Термолабильный энтеротоксин ( <i>lt</i> )	-
	Термостабильный энтеротоксин ( <i>st</i> )	-
	Шигаподобный токсин I-II ( <i>stx-I-II</i> )	-

«+» – ген присутствует; «-» – ген отсутствует.

*E. coli* O144, заключалась в широкой циркуляции их среди здорового населения. При анализе частоты выделения этих микроорганизмов из различных по эпидемиологической характеристике источников (пациенты с ОКИ, лица, обследованные с профилактической целью) установлено, что они чаще выделялись от лиц, обследовавшихся с профилактической целью без клинических симптомов ОКИ (52,7%), что в 2–3 раза превышало их обнаружение у заболевших ОКИ. Широкая циркуляция среди здорового населения штаммов *E. coli* O144 не позволяет с уверенностью отнести их к истинным возбудителям эшерихиозов. Основным критерием патогенности диареогенных *E. coli* является наличие у них генов вирулентности, кодирующих факторы патогенности (адгезинов, инвазинов, токсинов и др.) [12, 13]. Детекция диареогенных *E. coli*, основанная только на определении серологической группы штамма, без детекции серологического варианта, факторов или генов вирулентности не позволяет достоверно определить их этиологическую значимость.

К настоящему времени известны три ферментативных варианта *E. coli* O144, дифференцируемые на основании семи тестов: подвижности, ферментации глюкозы, лактозы, дульцита, сорбита, салицина и декарбок্সилирования лизина. К биовару 1 относят неподвижные штаммы *E. coli* O144:K:HNM. К биовару 2 – подвижные штаммы с Н-антигеном 4 (серовар *E. coli* O144:K: H4), биовар 3 включает два серовара с Н-антигенами 18 и 25 (серовары *E. coli* O144:K:H18 и *E. coli* O144:K:H25).

Среди изученных нами штаммов *E. coli* O144, выделенных в последние 18 лет, отсутствовали штаммы, идентичные биоварам 1 и 3, т.е. «классическим» EIEC. Биовару 2 были идентичны 15% подвижных штаммов, остальные 85% штам-

мов были неподвижными, так же, как и биовар 1, характеризовались ферментативными свойствами, которые не соответствовали известным биоварам 1–3. Эти отличия позволили нам выделить «современные» штаммы *E. coli* O144 в отдельный биовар 4 и более детально изучить другие биологические свойства (табл. 1).

В настоящее время из-за отсутствия отечественных наборов Н-сывороток идентифицировать Н-антиген, т.е. серологический вариант *E. coli* O144, классическим методом у «современных» штаммов биовара 4 не представляется возможным. Традиционная фенотипическая серологическая идентификация *E. coli* является дорогостоящей, трудоемкой, требующей опыта и специальных ресурсов (для типирования О-антигена – 188 сывороток и Н-антигена – 53 сыворотки), что привело к созданию ограниченного числа референс-лабораторий во многих странах, которые используют для определения серогруппы и серовара штаммов «молекулярное» серотипирование – детекцию генов, кодирующих О- и Н-антигены. Исследователями Центра геномной эпидемиологии (CGE) Датского технического университета (DTU) (<http://www.genomicepidemiology.org>) был разработан доступный веб-инструмент SerotypeFinder, позволяющий определить серогруппу и серовар *E. coli* на основании данных полногеномного секвенирования [14].

Анализ нуклеотидных последовательностей подвижных штаммов *E. coli* O144 биовара 4 с использованием базы данных SerotypeFinder позволил установить серологический вариант O144:H45.

У всех штаммов биоваров 4 *E. coli* O144:H45 не были обнаружены гены, кодирующие факторы патогенности, характерные для *Shigella spp.* и EIEC: плазмидные (*ipaH*) и хромосомные (*ial*) гены инвазивности. У штаммов не выявлены другие гены, наличие которых характерно для других патогенных диареогенных *E. coli*, кодирующих адгезию (*eae*, *bfp*, *aaf*), продукцию шигаподобных токсинов (*stx1*, *stx2*) и энтеротоксинов (*lt*, *st*). Штаммы *E. coli* O144:H45 биовара 4 не имели генов, характерных для группы ExPEC – возбудителей парентеральных эшерихиозов (*pap*, *sfa*, *afa*, *hly*, *cnf*).

Результаты изучения штаммов *E. coli* O144:H45 биовара 4 представлены в таблице 2.

Из 259 штаммов *E. coli* O144 устойчивыми к одному или нескольким АМП оказались 21 (8,1 ± 1,5)% штамм: к ампициллину – 9 (3,6 ± 1,1)%, амоксицилину – 2 (0,7 ± 0,5)%, тетрациклину – 9 (3,6 ± 1,1)%, хлорамфениколу – 1 (0,4 ± 0,4)%, нитрофуранам – 7 (2,5 ± 0,9)% штаммов соответственно.

К цефалоспорином III поколения (цефотаксиму и цефтазидиму), аминогликозидам (гентамицину, тобрамицину, амикацину), хинолонам/фторхинолонам (налидиксовой кислоте, цiproфлоксацину), а также к ко-тримоксазолу (триметоприму/сульфаметоксазолу) все изученные штаммы сохраняли чувствительность.

## Заключение

Штаммы *E. coli* O144, циркулировавшие в Санкт-Петербурге в последние десятилетия, на основании ферментативных свойств, серотиповой характеристики, установленной молекулярно-генетическими методами, принадлежат к ранее неизвестному биовару 4 серовару O144:H45.

Отсутствие генов, контролирующих основные факторы вирулентности, характерные для EIEC и других диареогенных *E. coli*, а также для штаммов *E. coli*, способных вызывать внекишечную патологию, не позволяют признать такие штаммы истинными возбудителями ОКИ у людей.

Основным итогом представленных исследований следует считать то, что популяция *E. coli* серологической группы O144, официально входящая в группу диареогенных энтероинвазивных *E. coli* – возбудителей ОКИ, включает несколько серологических и ферментативных вариантов, штаммы которых гетерогенны по основному признаку EIEC – наличию генов, кодирующих фактор вирулентности – инвазию. Для детекции возбудителей ОКИ (EIEC O144) необходимо определение факторов вирулентности или генов, кодирующих их. Установление серологического или ферментативного вариантов имеет эпидемиологическое значение в качестве «эпидемиологических» маркеров штаммов после подтверждения патогенности изолята.

## Литература

1. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2017 году». М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2018, 268 с.
2. Методические указания МУ 04-723/3 «Микробиологическая диагностика заболеваний, вызванных энтеробактериями».
3. Энтеробактерии. Руководство для врачей. Под ред. В.И.Покровского. М.: Медицина; 1985, с. 57-87.
4. Wood PK, Morris JC, Small PL, Sethabutr O, Toledo MR, Trabulsi L, Kaper JB. Comparison of DNA probes and the Sereny test for Identification of invasive *Shigella* and *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol. 1986 Sep;24(3):498-500.
5. Черкасский БЛ. Эпидемиология эшерихиозов в Российской Федерации. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2002;5:6-10.
6. Киселева БС, Скибенко ЛВ, Гедзе ГИ, и др. Характеристика эшерихий серологической группы O144:K, выделенных при острых кишечных заболеваниях. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1975;5:49-52.
7. Новгородская ЭМ. О дизентериеподобных заболеваниях взрослых и детей, вызываемых энтеропатогенными кишечными палочками. Острые кишечные инфекции. 1970:117-32.
8. Pasqua M, Micheacci V, Martino M, Tozzoli R, Grossi M, Colonna B, et al. The intriguing evolutionary journey of enteroinvasive *E.coli* (EIEC) toward pathogenicity. Front Microbiol. 2017 Dec 5;8:2390. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02390
9. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Клинические рекомендации, версия 2018-03.
10. Guion CE, Ochoa TJ, Walker CM, Barletta F, Cleary TG. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2008 May;46(5):1752-7. DOI: 10.1128/JCM.02341-07
11. Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. FEMS Immunol Med Microbiol. 1995 Oct;12(2):85-90. DOI: 10.1111/j.1574-695X.1995.tb00179.x
12. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol Rev. 1988;11(1):142-201.
13. Gomes T, Elias WP, Scaletsky IC, Guth BE, Rodrigues JF, Piazza RM, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Braz J Microbiol. 2016 Dec;47 Suppl 1:3-30. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.10.015
14. Jenkins C. Whole-Genome Sequencing Data for Serotyping *Escherichia coli* – It's Time for a Change! J Clin Microbiol. 2015 Aug;53(8):2402-3. DOI: 10.1128/JCM.01448-15

## References

1. State Report "Situation of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2017". Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 2018, 268 p. (In Russian).
2. Guidelines MU 04-723/3 "Microbiological diagnosis of diseases caused by enterobacteria". (In Russian).
3. Enterobakterii [Enterobacteria]. Edited by V.I.Pokrovskii. Moscow: "Meditcina"; 1985, pp. 57-87. (In Russian).
4. Wood PK, Morris JC, Small PL, Sethabutr O, Toledo MR, Trabulsi L, Kaper JB. Comparison of DNA probes and the Sereny test for Identification of invasive *Shigella* and *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol. 1986 Sep;24(3):498-500.
5. Cherkasskii BL. Epidemiologiya esherikhiozov v Rossiiskoi Federatsii. Epidemiology and Infectious Diseases. 2002;5:6-10. (In Russian).
6. Kiseleva BS, Skibenko LV, Gedze GI, et al. Kharakteristika esherikhii serologicheskoi gruppy O144:K, vydelennykh pri ostrykh kishhechnykh zabolovaniyakh. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 1975;5:49-52. (In Russian).
7. Novgorodskaya EM. O dizenteriepodobnykh zabolovaniyakh vzroslykh i detei, vyzvaemykh enteropatogennymi kishhechnymi palochkami. Ostrye kishhechnye infektsii. 1970:117-32. (In Russian).
8. Pasqua M, Micheacci V, Martino M, Tozzoli R, Grossi M, Colonna B, et al. The intriguing evolutionary journey of enteroinvasive *E.coli* (EIEC) toward pathogenicity. Front Microbiol. 2017 Dec 5;8:2390. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02390
9. Determination of sensitivity of microorganisms to antimicrobial agents. Clinical guidelines, version 2018-03. (In Russian).
10. Guion CE, Ochoa TJ, Walker CM, Barletta F, Cleary TG. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2008 May;46(5):1752-7. DOI: 10.1128/JCM.02341-07
11. Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. FEMS Immunol Med Microbiol. 1995 Oct;12(2):85-90. DOI: 10.1111/j.1574-695X.1995.tb00179.x
12. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol Rev. 1988;11(1):142-201.
13. Gomes T, Elias WP, Scaletsky IC, Guth BE, Rodrigues JF, Piazza RM, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Braz J Microbiol. 2016 Dec;47 Suppl 1:3-30. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.10.015
14. Jenkins C. Whole-Genome Sequencing Data for Serotyping *Escherichia coli* – It's Time for a Change! J Clin Microbiol. 2015 Aug;53(8):2402-3. DOI: 10.1128/JCM.01448-15.

---

### Информация об авторах:

Кафтырева Лидия Алексеевна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией кишечных инфекций ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», профессор кафедры медицинской микробиологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова»  
Адрес: 197111, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14  
Телефон: (812) 232-4883

Матвеева Зоя Николаевна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»  
Адрес: 197111, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14  
Телефон: (812) 232-4883

---

### Information about authors:

Lidia A. Kaftyreva, MD, PhD, DSc, head of the laboratory of enteric infections, Saint-Petersburg Pasteur Institute, professor of the department of medical microbiology, North-Western State Medical University named after I.I.Mechnikov  
Address: 14 Mira str., St. Petersburg, 197111, Russian Federation  
Phone: (812) 232-4883

Zoya N. Matveeva, MD, PhD, leading researcher of the laboratory of enteric infections, Saint-Petersburg Pasteur Institute  
Address: 14 Mira str., St. Petersburg, 197111, Russian Federation  
Phone: (812) 232-4883



# Лиофилизация коллекционных штаммов холерных вибрионов на аппарате коллекторного типа с использованием адсорбентов

О.С.Чемисова, М.М.Сагакянц, Е.Н.Голенищева, М.В.Полеева, И.В.Морозова

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

Разработан алгоритм лиофильного высушивания штаммов холерных вибрионов с применением адсорбентов на установке Alpha 1-4 LSC Martin Christ коллекторного типа. Определены показатели выживаемости клеток штаммов *V. cholerae*, адсорбированных на активированном угле, силикагеле и крахмале. Наилучшие результаты жизнеспособности клеток после лиофилизации были зафиксированы у штаммов *V. cholerae*, адсорбированных на крахмале, – показатель выживаемости составил 44,8%, в то время как на силикагеле и активированном угле – 27,3% и 20,0% соответственно. Подобран протектор, обеспечивающий сохранение жизнеспособности культур микроорганизмов при лиофилизации.

**Ключевые слова:** *Vibrio cholerae*, лиофилизация, адсорбент

**Для цитирования:** Чемисова О.С., Сагакянц М.М., Голенищева Е.Н., Полеева М.В., Морозова И.В. Лиофилизация коллекционных штаммов холерных вибрионов на аппарате коллекторного типа с использованием адсорбентов. Бактериология. 2018; 3(4): 16–20. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-16-20

## Lyophilization of collection strains of *Vibrio cholerae* on a collector-type apparatus using adsorbents

O.S.Chemisova, M.M.Sagakyants, E.N.Golenischeva, M.V.Poleeva, I.V.Morozova

The Rostov-on-Don Institute for Plague Control, Rostov-on-Don, Russian Federation

An algorithm has been developed for freeze-drying strains of *Vibrio cholerae* using adsorbents on an Alpha 1-4 LSC Martin Christ collector type plant. The survival rates of cells of *V. cholerae* strains adsorbed on activated carbon, silica gel, and starch were determined. The best results of cell viability after lyophilization were recorded in *V. cholerae* strains adsorbed on starch – the survival rate was 44.8%, while on silica gel and activated carbon was 27.3% and 20.0%, respectively. A protector was selected to ensure the preservation of the viability of cultures of microorganisms during lyophilization.

**Keywords:** *Vibrio cholerae*, lyophilization, adsorbent

**For citation:** Chemisova O.S., Sagakyants M.M., Golenischeva E.N., Poleeva M.V., Morozova I.V. Lyophilization of collection strains of *Vibrio cholerae* on a collector-type apparatus using adsorbents. Bacteriology. 2018; 3(4): 16–20. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-16-20

Известно много методов консервации коллекционных бактериальных штаммов как краткосрочного (периодические пересевы на свежие питательные среды – субкультивирование, хранение под стерильным парафином и стерильным вазелиновым маслом, хранение в водной и фосфатно-буферной средах, хранение высушиванием на твердых носителях, хранение при температурах ниже точки

кристаллизации воды), так и длительного характера (лиофилизация, консервация замораживанием при низких температурах, L-высушивание). Каждый метод имеет свои достоинства и недостатки [1–3].

В настоящее время одним из наиболее эффективных и широко используемых методов длительного хранения с сохранением жизнеспособности коллекционных культур

### Для корреспонденции:

Чемисова Ольга Сергеевна, кандидат биологических наук, врио зам. директора по научной работе, заведующая Музеем живых культур с центром патогенных для человека вибрионов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

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

Телефон: (863) 240-2703

E-mail: chemisova@inbox.ru

Статья поступила 17.10.2018 г., принята к печати 25.12.2018 г.

### For correspondence:

Olga S. Chemisova, PhD of Biology Sciences, acting deputy director on scientific work, Head of the Museum of living cultures with the Centre pathogenic to humans vibrios, Rostov-on-Don Anti-plague Institute of Rosptrebnadzor

Address: 117/40, Maksima Gorkogo str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation

Phone: (863) 240-2703

E-mail: chemisova@inbox.ru

The article was received 17.10.2018, accepted for publication 25.12.2018

микроорганизмов является лиофилизация [4]. Лиофилизация – это высушивание клеток в вакууме из замороженного состояния, минуя жидкую фазу [1, 5]. Этот метод считается одним из самых экономичных и эффективных для длительного хранения микроорганизмов. Впервые этот метод был использован в 1890 г. Альтманом для гистологических исследований, а первые опыты по лиофилизации бактерий в 1909–1914 гг. провел Хаммер. С 40–50-х годов XX века лиофилизация стала широко использоваться для длительного, более 30 лет, хранения коллекционных культур бактерий, актиномицетов, мицелиальных грибов, дрожжей, водорослей, простейших, вирусов, вакцин.

Многочисленные исследования подтверждают тот факт, что в течение продолжительного времени лиофилизированные культуры микроорганизмов сохраняют присущие им культурально-морфологические, физиологические, биохимические признаки. Однако следует отметить, что в процессе лиофильной сушки и при дальнейшем хранении выживаемость микроорганизмов в препаратах зависит от многих факторов, среди которых важное значение имеют биологические особенности микроорганизма, специфическая чувствительность вида и штамма, стадия роста культур, концентрация клеток, условия культивирования, состав защитных сред, режим лиофилизации, условия хранения, показатели остаточной влажности [1, 6, 7].

Особенно важное значение при лиофилизации бактериальных клеток имеет состав защитных (суспензионных) сред. Эффективная защитная среда должна предохранять клетки от необратимых изменений в ходе замораживания, высушивания и при длительном хранении. Известно, что криопротекторными свойствами обладают как простые вещества в различных соотношениях (глюкоза, сахароза, галактоза, глутамат натрия, аспартат натрия, аскорбат натрия), так и сложные защитные среды (сыворотка крови, белки сыворотки, желатина, молоко, бульон, декстрин, крахмал, пептон). Более 70 лет универсальной средой для лиофильного высушивания бактерий является сахарозо-желатиновая среда Файбича.

В Ростовском-на-Дону противочумном институте Роспотребнадзора для поддержания специализированной коллекции холерных и других патогенных для человека вибрионов применяется лиофилизация на установке коллекторного типа в среде Файбича. Вибрионы относятся к группе микроорганизмов, наиболее чувствительных к стрессовым условиям процедуры сублимации [8]. Повреждение бактериальных клеток может происходить на всех этапах лиофилизации: во время предварительного замораживания бактериальной взвеси и непосредственно при дегидратации препарата в процессе сушки. Существует несколько факторов, обуславливающих повреждение клеток при замораживании: механический (повреждение в результате давления образующихся кристаллов льда), осмотический (за счет чрезмерной дегидратации клеток) и химический (вследствие гиперконцентрации солей как вне, так и внутри клеток). Процесс кристаллообразования зависит от скорости замораживания. При быстром замораживании образуются мелкие кристаллы льда, которые равномерно распределяются по всей толще замораживаемого препарата, при этом травмирующее действие кристаллов на клетки минималь-

но. Характер кристаллообразования зависит также от состояния и концентрации растворенных веществ, степени гидратации белков и других полимеров. Для коллоидных и полимерных материалов характерно присутствие адсорбционной влаги, которая удерживается у поверхности раздела коллоидных частиц с окружающей средой, благодаря молекулярно-силовому взаимодействию. Вода может переходить в льдоподобное кристаллическое состояние, когда ее молекулы располагаются в определенном порядке – тетраэдрическом, в то время как искажение водной структуры адсорбционно-связанной влаги является кинетическим препятствием для ее кристаллизации [9]. Можно предположить, что добавление адсорбентов в среду высушивания будет способствовать защите бактериальных клеток от повреждения кристаллами льда. Данные об использовании адсорбентов при лиофилизации патогенных вибрионов в литературе отсутствуют.

В связи с вышеизложенным, целью данной работы явилось изучение особенностей процесса лиофилизации холерных вибрионов на установке коллекторного типа с применением адсорбентов для повышения качества образцов коллекционных штаммов.

## Материалы и методы

Для нашего исследования были отобраны 5 штаммов *V. cholerae* O1 El Tor и 5 штаммов *V. cholerae* non O1/non O139. Штаммы были получены из коллекции Музея живых культур с Центром патогенных для человека вибрионов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора.

Штаммы *V. cholerae* культивировали на пластинках 2% агара Мартена (pH 7,6) при температуре 37°C в течение 18 ч. Далее отобранные колонии (не менее 20 типичных по морфологии) отсеивали на скошенный 2% агар Мартена (pH 7,6) в пробирках. Через 18–24 ч инкубации при температуре 37°C культуру из пробирки снимали стерильным шпателем и равномерно распределяли по поверхности скошенного 2% агара Мартена (pH 7,6) во флаконах. Чтобы получить микробную взвесь высокой концентрации (40–60 млрд микробных клеток в 1 мл), бактериальную массу смывали средой высушивания (среда Файбича (pH 7,2), содержащая 10% сахарозы, 1,5% желатина и 0,1% агара) в количестве 2,0–2,5 мл. Для ускорения смыва во флаконы опускали стерильные стеклянные поплавки.

В качестве адсорбентов были отобраны активированный уголь, силикагель и крахмал. В стерильные ампулы с перетяжкой из нейтрального стекла вносили один из адсорбентов в количестве, оптимальном для перевода в гелеобразное состояние 0,2 мл бактериальной взвеси (130 мг силикагеля, 70 мг активированного угля, 320 мг крахмала). Бактериальную взвесь холерных вибрионов в среде Файбича из флакона разливали в стерильные ампулы, заранее наполненные адсорбентами, в объеме 0,2 мл. По окончании розлива ампулы помещали в низкотемпературный холодильник (–70°C) на 2 ч, после чего подсоединяли к маркированным гребенкам лиофильного аппарата.

Лиофилизацию на коллекторной установке Alpha 1-4 LSC Martin Christ проводили в 2 этапа. Первый этап – это основ-

ная сушка (main drying), которую проводили при глубине вакуума 0,100 мбар, второй этап – заключительная сушка (final drying) – при 0,001 мбар. Длительность основного этапа сушки составила 3 ч, длительность заключительной сушки – 1 ч. По окончании лиофилизации ампулы отпаивали под вакуумом. В процессе отпайки постоянно вели наблюдение за показаниями вакуума.

Оценку жизнеспособности клеток холерных вибрионов до и после лиофилизации, в процессе хранения определяли путем высева на пластинки 2% агара Мартена (рН 7,6) с последующим подсчетом к первоначальному числу живых клеток, принятому за 100%.

Остаточную влажность лиофилизированных культур определяли общепринятым методом К.Е.Долинова (1955 г.), согласно инструкции по лиофильному высушиванию возбудителей инфекционных заболеваний I–IV групп на коллекторном аппарате системы К.Е.Долинова.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью пакета программ Microsoft Excel 2010 – определяли среднюю арифметическую ( $M$ ) и стандартную ошибку ( $m$ ).

### Результаты и обсуждение

Важнейшими пористыми сорбентами являются силикагель и активированный уголь [10, 11]. Силикагель как гидрофильный адсорбент представляет собой аэрогель, образующийся из перенасыщенных растворов кремниевых кислот ( $nSiO_2 \times mH_2O$ ) при рН  $\geq 5-6$ . Благодаря своим высоким гидрофильным свойствам силикагель очень хорошо адсорбирует воду с образованием водородной связи [12, 13].

Другим распространенным адсорбентом является гидрофобный активированный уголь (получают путем обработки древесного угля перегретым паром, который и удаляет из пор загрязняющие вещества, тем самым увеличивая общую поверхность угля и повышая адсорбционные качества), в порах которого существует межмолекулярное притяжение, приводящее к возникновению адсорбционных сил

(Ван-дер-Ваальсовы силы) [14, 15]. Кроме того, активированный уголь, возможно, играет роль нейтрализатора токсических веществ, образующихся в процессе лиофилизации.

В качестве адсорбента как поглотителя воды часто используется крахмал – смесь полисахаридов амилозы (10–20%) и амилопектина (80–90%), мономером которых является  $\alpha$ -глюкоза. Известно, что силикагель и активированный уголь имеют достаточно высокие удельные поверхности, благодаря которым и осуществляется физическая адсорбция. Так, полная удельная поверхность силикагеля, в зависимости от марки производства, приблизительно равна 216–690 м<sup>2</sup>/г, а у активированного угля – 478,8–1200 м<sup>2</sup>/г. У крахмала же отсутствует развитая поверхность, поэтому удельная поверхность практически равна нулю. По этой характеристике крахмал выступает очень слабым физическим адсорбентом, однако при нагревании сухого крахмала до 200–250°C происходит частичное его разложение и получается смесь менее сложных полисахаридов. Такое физическое изменение крахмала позволяет увеличить способность адсорбента удерживать влагу [10, 16].

Результаты определения количества жизнеспособных клеток штаммов *V. cholerae*, адсорбированных на носителях и подвергнутых лиофилизации, представлены в таблице 1.

Из представленных результатов видно, что лиофилизация оказывает влияние на выживаемость выбранного патогена, что находит отражение в изменении указанного показателя. При этом наибольшая выживаемость, а следовательно, и сохранность жизнеспособности отмечены в образцах, где в качестве адсорбента-стабилизатора выступает крахмал.

Полученный результат, по нашему мнению, может быть связан с изменением физико-химических свойств молекулы полимера, проявляющейся в частичной олигомеризации крахмала, что сопровождается высвобождением дополнительных функциональных групп и оказывает влияние на удержание влаги реакционной смесью. В совокупности с этим гелеобразный характер среды может создавать экранную условия, предотвращающие деструктивные влияния факторов лиофилизации.

Важнейшим аспектом создания и поддержания коллекции штаммов микроорганизмов является необходимость длительного их хранения после лиофилизации. При этом факторами, определяющими эффективность достижения указанной цели, является соблюдение температурного и временного режима. В связи с этим нами изучалось влияние выбранных адсорбентов на выживаемость штаммов *V. cholerae* при различных температурах хранения – 4°C и 37°C и сроках хранения – 14 сут, 3 мес, 1 год. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 1. Количество жизнеспособных клеток штаммов *V. cholerae* (м.к./мл), адсорбированных на носителях

Среда	До лиофилизации м.к./мл ( $M \pm m$ )	После лиофилизации, м.к./мл ( $M \pm m$ )	Показатель выживаемости, %
Среда Файбича	$(28,8 \pm 0,3) \times 10^9$	$(10,9 \pm 0,1) \times 10^9$	37,8 ± 1,1
Активированный уголь	$(28,8 \pm 0,3) \times 10^9$	$(57,7 \pm 0,7) \times 10^8$	20,0 ± 1,0
Силикагель	$(28,8 \pm 0,3) \times 10^9$	$(78,7 \pm 0,2) \times 10^8$	27,3 ± 1,2
Крахмал	$(28,8 \pm 0,3) \times 10^9$	$(12,9 \pm 0,1) \times 10^9$	44,8 ± 1,0

Таблица 2. Выживаемость штаммов *V. cholerae* (м.к./мл), адсорбированных на носителях, при хранении в ампулах в разных условиях

Адсорбент	14 суток			3 мес	1 год
	4°C ( $M \pm m$ )	25°C ( $M \pm m$ )	37°C ( $M \pm m$ )	4°C ( $M \pm m$ )	4°C ( $M \pm m$ )
Среда Файбича	$(4,1 \pm 0,4) \times 10^9$ 37,6 ± 1,3%	$(20,3 \pm 0,3) \times 10^8$ 18,6 ± 1,2%	$(3,1 \pm 0,2) \times 10^8$ 2,8 ± 1,3%	$(4,0 \pm 0,4) \times 10^9$ 36,7 ± 1,2%	$(3,8 \pm 0,3) \times 10^9$ 34,9 ± 1,1%
Активированный уголь	$(11,4 \pm 0,6) \times 10^8$ 19,7 ± 1,0%	$(48,4 \pm 0,4) \times 10^7$ 8,4 ± 1,4%	$(9,2 \pm 0,4) \times 10^7$ 1,6 ± 1,4%	$(11,0 \pm 0,3) \times 10^8$ 19,1 ± 1,3%	$(8,8 \pm 0,7) \times 10^8$ 15,2 ± 1,0%
Силикагель	$(21,1 \pm 0,4) \times 10^8$ 26,8 ± 1,2%	$(92,1 \pm 0,3) \times 10^7$ 11,7 ± 1,2%	$(14,2 \pm 0,5) \times 10^7$ 1,8 ± 1,2%	$(20,5 \pm 0,3) \times 10^8$ 26,0 ± 1,0%	$(13,7 \pm 0,4) \times 10^8$ 17,4 ± 1,2%
Крахмал	$(5,7 \pm 0,3) \times 10^9$ 44,2 ± 1,0%	$(31,3 \pm 0,3) \times 10^8$ 24,3 ± 1,5%	$(4,4 \pm 0,1) \times 10^8$ 3,4 ± 1,6%	$(5,6 \pm 0,6) \times 10^9$ 43,4 ± 1,3%	$(5,5 \pm 0,7) \times 10^9$ 42,6 ± 1,0%

Таблица 3. Прогнозируемые сроки хранения коллекционных штаммов *V. cholerae*, лиофилизированных на установке коллекторного типа Alpha 1-4 LSC Martin Christ

Среда	Прогноз сроков хранения коллекционных штаммов <i>V. cholerae</i> при температуре 4°C	
	сутки	годы
Среда Файбича	4878,9	13,9
Активированный уголь	1755	5
Силикагель	1053	3
Крахмал	9477	27

Из представленных результатов видно, что наибольшая выживаемость холерных вибрионов наблюдается при использовании в качестве адсорбента крахмала, причем эта закономерность сохраняется при различных сроках хранения. Однако следует отметить, что хранение лиофилизированных образцов при 37°C 3 мес и 1 год приводило к гибели бактериальных клеток независимо от типа адсорбента. Полученные нами результаты совпадают с данными литературы, согласно которым с увеличением температуры хранения коллекционных штаммов число жизнеспособных клеток резко уменьшается [1, 17].

Опытным путем доказано, что на жизнеспособность бактериальных клеток и их стабильность при хранении большое влияние оказывает остаточная влажность, которую мы определяли ускоренным методом К.Е.Долинова (досушивали образцы при температуре 100°C в течение 1 ч при атмосферном давлении). Согласно данному методу, оптимум остаточной влажности для бактериальных клеток, высушенных в среде Файбича, должен составлять от 2 до 3% [6, 18].

В наших экспериментах были подобраны показатели вакуума и длительность этапов высушивания, обеспечивающие значение остаточной влажности штаммов *V. cholerae*, адсорбированных на силикагеле – 3,1%, активированном угле – 2,7%, крахмале – 2,4%.

В таблице 3 представлен прогноз сроков хранения лиофилизированных коллекционных штаммов *V. cholerae*, высушенных на аппарате коллекторного типа Alpha 1-4 LSC Martin Christ.

Таким образом, нами подобран оптимальный состав защитной среды для лиофилизации, который наряду с криопротекторами включает адсорбент (крахмал). Сравнительный анализ показателей жизнеспособности бактериальных клеток после сублимационного высушивания свидетельствует о протективном действии крахмала. Предлагаемый способ может быть рекомендован для целей длительного сохранения коллекционных штаммов холерных вибрионов.

## Литература

1. Аркадьева ЗА. Хранение микроорганизмов. В кн.: Промышленная микробиология. Под ред. Н.С.Егорова. М.: Высшая школа; 1989, с. 149-167.
2. Похиленко ВД, Баранов АМ, Детушев КВ. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. 2009;4(12):99-121.
3. Чернин ЛС. Бактерии. В кн.: Итоги науки и техники. Общие проблемы биологии. Под ред. С.Г.Инге-Вечтомова. М.: ВИНТИ; 1982, с. 107-147.

4. Кошелев АВ, Нестеров АИ. Ускоренный тест прогнозирования выживаемости лиофилизированных культур метанотрофных бактерий. Микробиология. 1987;56(3):492-6.
5. Фирсов НН. Микробиология: словарь терминов. М.: Дрофа; 2005, с. 3-256.
6. Долинов КЕ. Основы технологии сухих препаратов. М.: Медицина; 1969, с. 3-231.
7. Лимарева ТД, Девякович ВН, Демешева МИ, Мезенцева ЛН, Рузавина ЕВ. Влияние условий сублимационного высушивания пробиотиков на специфическую активность. Сибирский медицинский журнал. 2009;24(2-2):68-71.
8. Осин АВ, Червякова НС, Валова ТВ. Лиофилизация штаммов патогенных микроорганизмов на сублимационных установках разного типа и оценка качества полученных препаратов. Проблемы особо опасных инфекций. 2016;(3):66-70. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-66-70
9. Грунин ЮБ, Грунин ЛЮ, Таланцев ВИ, Сафин РГ, Просвирников ДБ. Исследование влияния замораживания на состояние связанной воды в волокнах древесной целлюлозы. Вестник Казанского технологического университета. 2014;17(1):46-8.
10. Глинка НЛ. Общая химия. Учебное пособие для вузов. Л.: Химия; 1983, с. 3-702.
11. Садовничая ЛП, Хухрянский ВГ, Цыганенко АЯ. Биофизическая химия. К.: Вища шк. Головное изд-во; 1986, с. 3-271.
12. Адсорбционные свойства силикагелей [Electronic resource]. URL: [http://sinref.ru/000\\_uchebniki/04400promishlennost/007\\_promishlennii\\_absorberi\\_alohina\\_2013/006.htm](http://sinref.ru/000_uchebniki/04400promishlennost/007_promishlennii_absorberi_alohina_2013/006.htm) (accessed 15.10.2018)
13. Статья о силикагеле [Electronic resource]. URL: <http://sorbis-group.com/articles/statia-silikagel.html> (accessed 15.10.2018).
14. Пилипенко АТ, Починков ВЯ, Середа ИП, Шевченко ФД. Справочник по элементарной химии. Под общей редакцией А.Т.Пилипенко. Киев: Наукова думка; 1978, с. 3-542.
15. Активированный уголь. Химические системы [Electronic resource]. URL: <http://chemsystem.ru/catalog/386/> (accessed 15.10.2018).
16. Хлытина АА, Матюшин АА. Поиск эффективных сорбентов путем определения их удельной адсорбции. Здоровье и образование в XXI веке. 2018;20(2): 93-97. DOI: <http://dx.doi.org/10.26787/nydha-2226-7425-2018-20-2>.
17. Червякова НС, Валова ТВ, Осин АВ. Использование лиофильных аппаратов камерного типа в коллекциях патогенных микроорганизмов. Проблемы особо опасных инфекций. 2014;(3):65-8.
18. Сидякина ТМ. Консервация генетических ресурсов. Консервация микроорганизмов (Информационный материал). Пушино, 1985, с. 3-64.

## References

1. Arkad'eva ZA. Khranenie mikroorganizmov [Storage of microorganisms]. In: Promyshlennaya mikrobiologiya [Industrial Microbiology]. Edited by N.S.Egorov. Moscow: "Vysshaya shkola" Publ.; 1989, pp. 149-167. (In Russian).
2. Pokhilenko VD, Baranov AM, Detushev KV. Methods of long-term storage of collection cultures of microorganisms and development trends. News of higher educational institutions. University proceedings. Volga region. Medical sciences. 2009;4(12):99-121. (In Russian).
3. Chernin LS. Bakterii [Bacteria]. In: Itogi nauki i tekhniki. Obshchie problemy biologii [Results of science and engineering. General problems of biology]. Edited by S.G.Inge-Vechtomov. Moscow, 1982, pp. 107-147. (In Russian).
4. Koshelev A, Nesterov AI. An express test for predicting the survival of freeze-dried methanotrophous bacterial cultures. Microbiology. 1987;56(3):492-6. (In Russian).
5. Firsov NN. Mikrobiologiya: slovar' terminov [Microbiology: Glossary of terms]. Moscow: "Drofa" Publ.; 2005, pp. 3-256. (In Russian).
6. Dolinov KE. Osnovy tekhnologii sukhikh preparatov [Fundamentals of technology of dry preparations]. Moscow: "Meditsina" Publ.; 1969, pp. 3-231. (In Russian).

7. Limareva TD, Devyakovich VN, Demesheva MI, Mezentseva LN, Rouzavina YeV. Influence of sublimation drying of probiotics on their specific activity. *Siberian Medical Journal*. 2009;24(2-2):68-71. (In Russian).
8. Osin AV, Chervyakova NS, Valova TV. Lyophilization of Pathogenic Microorganisms Strains on Freeze-Drying Modules of Different Type, and Quality Assessment of the Preparations Obtained. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;(3):66-70. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-66-70 (In Russian).
9. Grunin YuB, Grunin LYu, Talantsev VI, Safin RG, Prosvirnikov DB. Study of the effect of freezing on the state of bound water in wood pulp fibers. *Bulletin of Kazan technological University*. 2014;17(1):46-8. (In Russian).
10. Glinka NL. *Obshchaya khimiya [General chemistry]*. L.: "Khimiya" Publ.; 1983, pp. 3-702. (In Russian).
11. Sadovnichaya LP, Khukhryanskii VG, Tsyganenko AY. *Biofizicheskaya khimiya [Biophysical chemistry]*. K.: "Vishcha shk" Publ.; 1986, pp. 3-271. (In Russian).
12. Adsorption properties of silica gels [Electronic resource]. URL: [http://sinref.ru/000\\_uchebniki/04400promishlennost/007\\_promishlennii\\_absorberi\\_alohina\\_2013/006.htm](http://sinref.ru/000_uchebniki/04400promishlennost/007_promishlennii_absorberi_alohina_2013/006.htm) (accessed 15.10.2018) (In Russian).
13. Article on silica gel [Electronic resource]. URL: <http://sorbis-group.com/articles/statia-silikagel.html> (accessed 15.10.2018). (In Russian).
14. Pilipenko AT, Pochinok VYa, Sereda IP, Shevchenko FD. *Spravochnik po elementarnoi khimii [Elementary chemistry handbook]*. Edited by A.T.Pilipenko. Kiev: "Naukova dumka" Publ.; 1978, pp. 3-542. (In Russian).
15. Activated carbon. *Chemical Systems [Electronic resource]*. URL: <http://chemsystem.ru/catalog/386/> (accessed 15.10.2018). (In Russian).
16. Chlitina AA, Matyushin AA. Search for effective adsorbents by determining their specific adsorption. *Health & Education Millemium*. 2018;20(2): 93-97. DOI: <http://dx.doi.org/10.26787/nydha-2226-7425-2018-20-2>. (In Russian).
17. Chervyakova NS, Valova TV, Osin AV. Application of Freeze-Dryers of Chamber Type in the Collections of Pathogenic Microorganism. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2014;(3):65-8. (In Russian).
18. Sidyakina TM. Genetic resources conservation. Conservation of microorganisms (Information material). Pushchino, 1985, pp. 3-64. (In Russian).

#### Информация об авторах:

Сагакянц Маргарита Мардиросовна, младший научный сотрудник Музея живых культур с центром патогенных для человека вибрионов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора  
Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40  
Телефон: (863) 240-2703

Голенищева Елена Николаевна, научный сотрудник Музея живых культур с центром патогенных для человека вибрионов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора  
Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40  
Телефон: (863) 240-2703

Полеева Марина Владимировна, научный сотрудник Музея живых культур с центром патогенных для человека вибрионов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора  
Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40  
Телефон: (863) 240-2703

Морозова Инна Владимировна, научный сотрудник Музея живых культур с центром патогенных для человека вибрионов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора  
Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40  
Телефон: (863) 240-2703

#### Information about authors:

Margarita M. Sagakyants, junior researcher, Museum of living cultures with the Centre for human pathogenic vibrios, Rostov-on-Don Anti-plague Institute of Rosptrebnadzor  
Address: 117/40, Maksima Gorkogo Str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation  
Phone: (863) 240-2703

Elena N. Golenishcheva, research associate, Museum of living cultures with the Centre for human pathogenic vibrios, Rostov-on-Don Anti-plague Institute of Rosptrebnadzor  
Address: 117/40, Maksima Gorkogo Str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation  
Phone: (863) 240-2703

Marina V. Poleeva, research associate, Museum of living cultures with the Centre for human pathogenic vibrios, Rostov on-Don Anti-plague Institute of Rosptrebnadzor Rostov-on-Don Anti-plague Institute of Rosptrebnadzor  
Address: 117/40, Maksima Gorkogo Str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation  
Phone: (863) 240-2703

Inna V. Morozova, research associate, Museum of living cultures with the Centre for human pathogenic vibrios, Rostov on-Don Anti-plague Institute of Rosptrebnadzor  
Address: 117/40, Maksima Gorkogo Str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation  
Phone: (863) 240-2703

## НОВОСТИ НАУКИ

### Микробиота в кишечнике способствует росту опухолей

Группа профессора Дирка Халлера из Технического университета Мюнхена сделала неожиданное открытие при исследовании факторов, вызывающих рак толстой кишки: клеточный стресс в сочетании с измененной микробиотой в толстой кишке стимулирует рост опухоли. Ранее предполагалось, что эта комбинация только способствует воспалительным заболеваниям кишечника.

*Coleman O.I., et al.*

*Activated ATF6 Induces Intestinal Dysbiosis and Innate Immune Response to Promote Colorectal Tumorigenesis. Gastroenterology. 2018;155(5):1539-1552.e12.*



# Инновационные приемы при бактериологическом исследовании на листериоз

И.А.Деревянченко<sup>1</sup>, Е.В.Смирнова<sup>1</sup>, Л.А.Краева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Филиал ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург» в Невском и Красногвардейском районах, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, Российская Федерация

В последние годы инфекция, обусловленная листериями, приобретает все большую актуальность. Расширение ассортимента потребляемых сыров, рыбных и мясных продуктов, в том числе из мяса диких животных, требует постоянного контроля производимой продукции. Авторы статьи предложили оптимизировать бактериологический метод исследования, доступный в лаборатории любого уровня оснащения. Для этого предложено использовать несколько дополнительных простых тестов, которые позволяют дифференцировать различные виды листерий.

Кроме того, для скрининга продуктов питания и смывов на листерии предложен быстрый, достоверный и недорогой способ межвидовой идентификации бактерий рода *Listeria*, основанный на классическом бактериологическом исследовании. Для его реализации используют чиповые технологии, позволяющие значительно экономить расходные материалы и сокращать время проведения исследования. Технологические решения в виде автоматизированного считывания результата и обработки полученной информации с помощью специальных компьютерных программ дают возможность получить объективный результат высокого уровня достоверности (87%) через 3 часа. При разработке способа выращивания и идентификации бактерий использовали технологии лаборатории-на-чипе. Биологическую пробу выращивали в специальном ростовом блоке на платформе в виде чипа. Результаты роста бактерий регистрировали при помощи микроскопии сформировавшихся микроколоний при увеличении в 630 раз. Визуальные образы микроколоний были обработаны с помощью компьютерной программы. Результат исследования содержит данные о виде бактерий и количестве микроорганизмов в исследуемом образце. Авторская разработка защищена тремя патентами.

**Ключевые слова:** *Listeria*, лабораторная диагностика, бактериологическое исследование, экспрессная идентификация, лаборатория-на-чипе

**Для цитирования:** Деревянченко И.А., Смирнова Е.В., Краева Л.А. Инновационные приемы при бактериологическом исследовании на листериоз. Бактериология. 2018; 3(4): 21–25. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-21-25

## Innovative approaches at bacteriological research on listeriosis

I.A.Derevyanchenko<sup>1</sup>, E.V.Smirnova<sup>1</sup>, L.A.Krayeva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Branch of Center for Hygiene and Epidemiology in the city of St. Petersburg in the Nevsky and Krasnogvardeisky districts, St. Petersburg, Russian Federation;

<sup>2</sup>Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

In recent years the infection caused by *Listeria* is becoming increasingly important. Expanding the range of consumed cheeses, fish and meat products, including meat from wild animals, requires constant monitoring of products. The authors of the article proposed to optimize the bacteriological method of research available in the laboratory of any level of equipment. For this purpose, it is proposed to use several additional simple tests that allow to differentiate various types of *Listeria*.

In addition, a fast, reliable and inexpensive method of identification of bacteria of the genus *Listeria*, based on a classical bacteriological study, is proposed for screening of food products and flushes on *Listeria*. For its implementation, chip technologies are used to significantly save consumables and reduce the time of the study. Technological solutions in the form of automated reading of the result and processing of the information obtained with the help of special computer programs make it possible to obtain an objective result of a high level of reliability (87%) in 3 hours. In developing the method of cultivation and identification of bacteria used technologies lab-on-a-chip. The biological sample was grown in a special growth block on a platform in the form of a chip. The results of bacterial growth were recorded by microscopy of the microcolonies formed with an increase of 630 times. Visual images of microcolonies were processed with the help of a computer program. The result of the study contains data on the type of bacteria and the number of microorganisms in the test sample. The author's development is secured by three patents.

**Keywords:** *Listeria*, laboratory diagnostics, bacteriological research, express identification, laboratory-on-chip

**For citation:** Derevyanchenko I.A., Smirnova E.V., Krayeva L.A. Innovative approaches at bacteriological research on listeriosis. Bacteriology. 2018; 3(4): 21–25. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-21-25

### Для корреспонденции:

Краева Людмила Александровна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией медицинской бактериологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора

Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14

Телефон: (812) 498-0939

E-mail: lykraeva@yandex.ru

Статья поступила 17.10.2018 г., принята к печати 25.12.2018 г.

### For correspondence:

Ludmila A. Kraeva, MD, PhD, DSc, head of the laboratory of medical bacteriology, Saint-Petersburg Pasteur Institute

Address: 14 Mira str., St. Petersburg, 197101, Russian Federation

Phone: (812) 498-0939

E-mail: lykraeva@yandex.ru

The article was received 17.10.2018, accepted for publication 25.12.2018

**Н**есмотря на то что возбудитель листериоза был открыт более 100 лет назад, интерес ученых и клиницистов к листериозной инфекции значительно возрос лишь в последние 20 лет. Заболеваемость листериозом в 2017 г. в высоко-развитых странах составила от 0,3‰ до 1,5‰, в России – 0,04‰. При этом показатели в крупных регионах превышают таковые по стране в 4 раза, что объясняется разным качеством клинической и лабораторной диагностики [1–3]. Так, в 2017 г. в стране было зарегистрировано 58 случаев листериозной инфекции (0,04 на 100 тыс. населения) с преимущественной регистрацией в Москве и Санкт-Петербурге (22 и 15 случаев соответственно). Однако показатель заболеваемости выше в Санкт-Петербурге (0,29‰), чем в Москве (0,18‰). В остальных регионах отмечались единичные случаи листериоза, хотя, учитывая схожие факторы передачи возбудителя инфекции и его устойчивость во внешней среде, можно было бы ожидать высоких цифр заболеваемости в Сибирском и Дальневосточном округах Российской Федерации (РФ).

Особое значение в патологии человека имеет возможность передачи листерий от инфицированной беременной женщины к плоду [4]. Тем не менее, по международному классификатору болезней МКБ-10, листериоз представлен еще в нескольких позициях: кожный листериоз, листериозный менингит и менингоэнцефалит, листериозная септицемия, другие формы листериоза [5, 6]. Причем смертность при осложнениях, обусловленных несвоевременной постановкой диагноза, может достигать 30% [7–9]. Так, в РФ смертность от листериоза в 2017 г. составила 26% от числа заболевших: в Санкт-Петербурге – 0,08‰, в Москве – 0,04‰ (по данным отчетных форм ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» за 2017 г.).

Возбудителем листериоза у людей чаще всего является *Listeria monocytogenes*, хотя нельзя исключать возможности заражения любым другим видом из 19 известных. По данным зарубежных авторов, наиболее часто продукты питания контаминированы, помимо *L. monocytogenes*, следующими видами листерий: *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. grayii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* [10–14]. Поэтому важно уметь не только своевременно выделить культуру листерий, но и идентифицировать ее до вида.

**Цель работы:** предложить быстрый, достоверный и недорогой способ межвидовой идентификации бактерий рода *Listeria*.



*L. monocytogenes*



*L. innocua*



*L. welshimeri*



*L. ivanovii*

Рис. 1. Вид микроколоний листерий после инкубации 3 ч (×630).

Таблица. **Дополнительные характеризующие признаки для дифференциации биологических видов представителей рода *Listeria***

Вид <i>Listeria</i>	Характеризующий признак СAMP-тест с					
	β-гемолиз	<i>R. equi</i>	<i>S. aureus</i>	Лецитиназа (наличие)	D-аланин (расщепление)	Лизин (расщепление)
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	+	-	-
<i>L. innocua</i>	-	-	-	-	+	+
<i>L. ivanovii</i>	+	+	-	+	+	+
<i>L. seeligeri</i>	+	-	+	+	+	+
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	-	+	+
<i>L. grayii</i>	-	-	-	-	+	+

\*разные штаммы дают разную реакцию (16–84% позитивны).

### Материалы и методы

Изучены 118 штаммов листерий, выделенных из пищевых продуктов в Санкт-Петербурге в 2017–2018 гг. В работе использованы классический бактериологический метод, масс-спектрометрический метод, молекулярный (полимеразная цепная реакция, ПЦР), серологический метод, авторский способ идентификации бактерий по визуальному образу микроколоний.

При проведении классического бактериологического исследования использовали среду «ПБЛ Оболенск» и среду «ПАЛ Оболенск». Для дальнейшей характеристики и иден-

тификации культуры пересевали на мясопептонный агар с 1% глюкозы (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) и мясопептонный бульон (МПБ) с 1% глюкозы (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Биохимическую идентификацию осуществляли с помощью Microbact теста (Oxoid). Масс-спектрометрический анализ MALDI-TOF проводили на приборе Bruker Daltonics. Серологическое типирование осуществляли в реакции латекс-агглютинации (ЛАГ) на стекле с помощью «Латексной тест-системы *Listeria monocytogenes*» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Для проведения ПЦР использовали «Набор реагентов для определения ДНК *Listeria monocytogenes* в биологическом материале методом полимеразной цепной

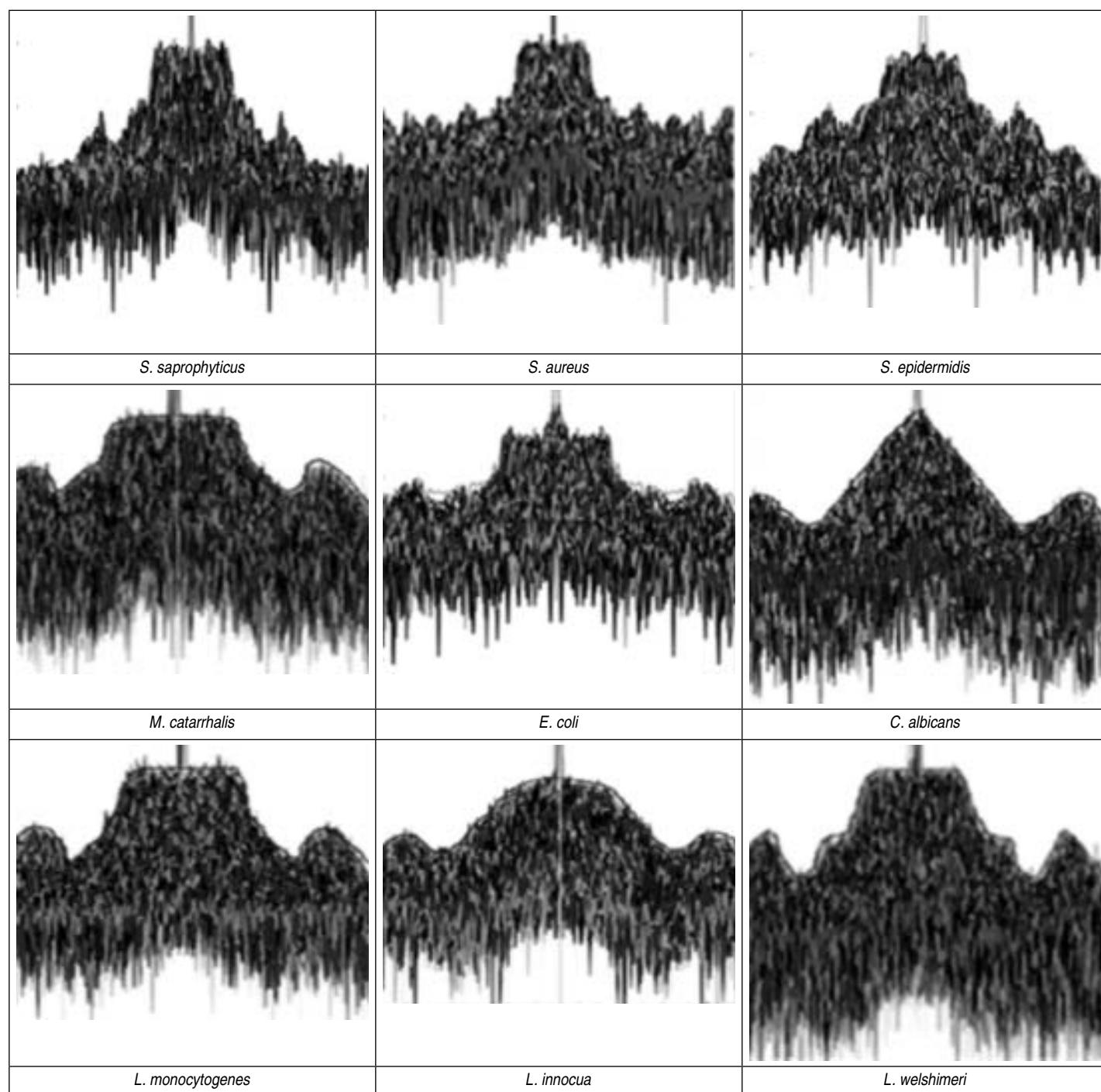


Рис. 2. 3D-спектры полученных шаблонов микроколоний некоторых бактерий.



реакции (ПЦР) «АмплиСенс® *Listeria monocytogenes*-скрин/монитор-FL».

Реализация авторского способа идентификации листерий до вида по визуальному образу микроколоний осуществлялась по разработанным и зарегистрированным ранее технологиям (патент «Способ выращивания колоний микробных клеток и устройство для его реализации» RU 2522005 (2014 г.), патент «Способ выращивания факультативно-анаэробных микроорганизмов» RU 2668172 (2016 г.)). Запись изображений выросших колоний проводилась через 3 ч роста на плотной питательной среде с помощью микроскопа AxioScore A1 (Zeiss, Германия) при увеличении  $\times 630$  и профессиональной цифровой камеры AxioCam HRC Rev3. Использовали специальный объектив N-achroplan, предназначенный для работы с 3D-образами. Изображения микроколоний с помощью встроенной компьютерной программы переводили в 3D-спектры и сравнивали с внутренней базой данных визуальных образов микроколоний бактерий («Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2018620878» (2018 г.)).

### Результаты и обсуждение

После исследования выделенных 118 штаммов листерий вышеперечисленными методами оказалось, что 73% из них представлены *L. monocytogenes*, 13% – *L. innocua*, 12% – *L. welshimeri*, 2% – *L. ivanovii*. Поскольку наиболее специфичным методом является молекулярный, то результаты, полученные в ПЦР-анализе, были приняты за основу. С полученными данными полностью совпали результаты серологического и масс-спектрометрического анализов. Кроме того, последний метод помог идентифицировать все виды выделенных листерий.

К сожалению, не все лаборатории пока оснащены необходимым оборудованием для проведения молекулярных и масс-спектрометрических методов исследования бактерий. Поэтому бактериологический метод, описанный в ГОСТ 32031-2012 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*», остается необходимым и востребованным. С помощью классического бактериологического метода были идентифицированы до вида 71% штаммов. Учитывая этот факт, авторами предложено дополнительно к стандартным коммерческим биохимическим наборам использовать несколько тестов, рекомендуемых в Определителе бактерий Берджи [15]. Одним из них является определение гемолитической и лецитиназной активностей. Однако надо иметь в виду, что они могут меняться в процессе накопления культуры и изучения штамма [16–18]. Поэтому необходимо работать с пробами и выделенными штаммами листерий быстро, не допуская множественных пересевов. Кроме того, целесообразно использовать CAMP-тест как со *Staphylococcus aureus*, так и с *Rhodococcus equi* (по возможности), тем более что эти тесты более стабильны, чем два предыдущих. Также помогают в дифференциации видов листерий простые тесты на выявление ферментов, расщепляющих лизин и D-аланин. Из всех наиболее часто встречающихся листерий только представители *L. monocytogenes* имеют эти ферменты. Использование указанных дополнительных тестов позволило правильно идентифици-

ровать 93% штаммов листерий. Такие характерные признаки представлены в таблице.

Однако такой метод диагностики, даже при использовании рекомендуемых питательных сред, позволяет дать результат лишь через 48 ч.

Применение инновационного способа выращивания бактерий и их идентификации по визуальному образу микроколоний дает возможность получить результат уже через 3 ч. Для этого исследуемый материал после прободготовки засевают на поверхность питательной среды в ростовом блоке лаборатории-на-чипе. Через 3 ч инкубации микроскопируют ростовую платформу (рис. 1) и с помощью компьютерной программы получают промежуточный результат в виде 3D-спектров (рис. 2), а затем в текстовом формате – результат идентификации выросших бактерий и число выросших колоний. С помощью такого способа были идентифицированы все штаммы изучаемых листерий. Этот экспрессный способ позволил получить результаты исследования, совпадающие на 87% с результатами ПЦР и MALDI-TOF.

Использование такого способа идентификации листерий позволяет недорого и быстро проводить скрининг продуктов питания и смывов на наличие в них любых листерий, в том числе патогенных. Более того, в 7% случаев при исследовании продуктов питания из одной пробы выделяли 2 вида листерий (например, *L. monocytogenes* и *L. innocua*). Причем использование среды обогащения зачастую приводило к вытеснению патогенных листерий и искажению результатов исследования, что согласуется с наблюдениями ряда исследователей [19, 20]. Поэтому крайне важно получить результат исследования из первичного посева образца.

### Выводы

1. Для улучшения дифференциации видов листерий при бактериологическом исследовании рекомендовано использовать ряд простых дополнительных тестов.
2. Предложен быстрый, достоверный и недорогой способ межвидовой идентификации бактерий рода *Listeria* – бактериологическое исследование в формате лаборатории-на-чипе.

### Литература

1. Олещенко ЕП, Алферова ЕВ. Листерии как возбудители пищевых инфекций. Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2012;49(3-4):211-2.
2. Храмов МВ, Костенко ЮГ, Юшина ЮК, Батаева ДС. Листерииоз: лабораторная диагностика в современных условиях. Инфекция и иммунитет. 2016;6(3):121.
3. Щербинин АВ, Мезенцев СВ, Спиркина ОС. Листерии в продукции мясоперерабатывающих предприятий. Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2014;8(118):101-4.
4. Бакулов ИА, Васильев ДА, Колбасов ДВ, и др. Листерии и листерииоз. 2-е издание, исправленное и дополненное. Ульяновск, 2016.
5. Farber J, Peterkin P. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol Rev. 1991 Sep;55(3):476-511.
6. Low J, Donachie W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. Vet J. 1997 Jan;153(1):9-29.
7. Painter J, Slutsker L. Listeriosis in humans. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007, p. 75-95.

8. Siegman-Igra Y, Levin R, Weinberger M, Golan Y, Schwartz D, Samra Z, et al. *Listeria monocytogenes* infection in Israel and review of cases worldwide. *Emerg Infect Dis.* 2002 Mar;8(3):305-10. DOI: 10.3201/eid0803.010195
9. Wing EJ, Gregory SH. *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update. *J Infect Dis.* 2002 Feb 15;185 Suppl 1:S18-24. DOI: 10.1086/338465
10. Chapin TK, Nightingale KK, Worobo RW, Wiedmann M, Strawn LK. Geographical and meteorological factors associated with isolation of *Listeria species* in New York State produce production and natural environments. *J Food Prot.* 2014 Nov; 77(11):1919-28. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-14-132.
11. Hofer E, Ribeiro R, Feitosa DP. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000 Sep-Oct;95(5):615-20.
12. Linke K, Rückerl I, Brugger K, Karpiskova R, Walland J, Muri-Klinger S, et al. Reservoirs of *Listeria species* in three environmental ecosystems. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Sep;80(18):5583-92. DOI: 10.1128/AEM.01018-14.
13. McAuley CM, Mcmillan K, Moore SC, Fegan N, Fox EM. Prevalence and characterization of foodborne pathogens from Australian dairy farm environments. *J Dairy Sci.* 2014 Dec;97(12):7402-12. DOI: 10.3168/jds.2014-8735
14. Stea EC, Purdue LM, Jamieson RC, Yost CK, Hansen LT. Comparison of the prevalences and diversities of *Listeria species* and *Listeria monocytogenes* in an urban and a rural agricultural watershed. *Appl Environ Microbiol.* 2015 Jun; 81(11):3812-22. DOI: 10.1128/AEM.00416-15
15. Vos P, Garrity GM, Jones D, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume Three, Phylum XIII - The Firmicutes, 2009, p. 244-256.
16. Ермолаева СА, Белый ЮФ, Тартаковский ИС. Изменение уровня экспрессии факторов вирулентности *Listeria monocytogenes* под влиянием внешних условий. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2000; 1:17-9.
17. Карпова ТИ, Ермолаева СА, Васкес-Боланд ХА. Новые методы идентификации *Listeria monocytogenes*. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2001;3(3):266-73.
18. Data AR, Kothary MH. Effects of glucose. Growth temperature, and pH on listeriolisine O production in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 1993 Oct;59(10):3495-7.
19. Cornu M, Kalmokoff M, Flandrois J-P. Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. *Int J Food Microbiol.* 2002 Mar;73(2-3):261-74.
20. Curiale MS, Lewus C. Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. *J Food Prot.* 1994;57:1048-51.
8. Siegman-Igra Y, Levin R, Weinberger M, Golan Y, Schwartz D, Samra Z, et al. *Listeria monocytogenes* infection in Israel and review of cases worldwide. *Emerg Infect Dis.* 2002 Mar;8(3):305-10. DOI: 10.3201/eid0803.010195
9. Wing EJ, Gregory SH. *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update. *J Infect Dis.* 2002 Feb 15;185 Suppl 1:S18-24. DOI: 10.1086/338465
10. Chapin TK, Nightingale KK, Worobo RW, Wiedmann M, Strawn LK. Geographical and meteorological factors associated with isolation of *Listeria species* in New York State produce production and natural environments. *J Food Prot.* 2014 Nov; 77(11):1919-28. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-14-132.
11. Hofer E, Ribeiro R, Feitosa DP. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000 Sep-Oct;95(5):615-20.
12. Linke K, Rückerl I, Brugger K, Karpiskova R, Walland J, Muri-Klinger S, et al. Reservoirs of *Listeria species* in three environmental ecosystems. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Sep;80(18):5583-92. DOI: 10.1128/AEM.01018-14.
13. McAuley CM, Mcmillan K, Moore SC, Fegan N, Fox EM. Prevalence and characterization of foodborne pathogens from Australian dairy farm environments. *J Dairy Sci.* 2014 Dec;97(12):7402-12. DOI: 10.3168/jds.2014-8735
14. Stea EC, Purdue LM, Jamieson RC, Yost CK, Hansen LT. Comparison of the prevalences and diversities of *Listeria species* and *Listeria monocytogenes* in an urban and a rural agricultural watershed. *Appl Environ Microbiol.* 2015 Jun; 81(11):3812-22. DOI: 10.1128/AEM.00416-15
15. Vos P, Garrity GM, Jones D, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume Three, Phylum XIII - The Firmicutes, 2009, p. 244-256.
16. Ermolaeva SA, Belyi YuF, Tartakovskii IS. Izmenenie urovnya ekspressii faktorov virulentnosti *Listeria monocytogenes* pod vliyaniem vneshnikh uslovii. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology.* 2000;1:17-9.
17. Karpova TI, Ermolaeva SA, Vaskes-Boland KhA. Novye metody identifikatsii *Listeria monocytogenes*. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2001;3(3):266-73.
18. Data AR, Kothary MH. Effects of glucose. Growth temperature, and pH on listeriolisine O production in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 1993 Oct;59(10):3495-7.
19. Cornu M, Kalmokoff M, Flandrois J-P. Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. *Int J Food Microbiol.* 2002 Mar;73(2-3):261-74.
20. Curiale MS, Lewus C. Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. *J Food Prot.* 1994;57:1048-51.

## References

### Информация об авторах:

Деревянченко Ирина Анатольевна, биолог бактериологической лаборатории филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург» в Невском и Красногвардейском районах  
 Адрес: 192012, Санкт-Петербург, ул. Ново-Александровская, 12  
 Телефон: (812) 362-4094  
 E-mail: tamiirina110804@mail.ru

Смирнова Елена Викторовна, врач-бактериолог, заведующая бактериологической лабораторией филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург» в Невском и Красногвардейском районах  
 Адрес: 192012, Санкт-Петербург, ул. Ново-Александровская, 12  
 Телефон: (812) 362-4094  
 E-mail: elenasmirno@yandex.ru

### Information about authors:

Irina A. Derevjanchenko, biologist, Center of hygiene and epidemiology in the city of St. Petersburg in the Nevsky and Krasnogvardeisky districts  
 Address: 12, Novo-Aleksandrovskaya str., St. Petersburg, 192012, Russian Federation  
 Phone: (812) 362-4094  
 E-mail: tamiirina110804@mail.ru

Elena V. Smirnova, bacteriologist, head of bacteriological laboratory Center of hygiene and epidemiology in the city of St. Petersburg in the Nevskom and Krasnogvardeiskom districts  
 Address: 12, Novo-Aleksandrovskaya str., St. Petersburg, 192012, Russian Federation  
 Phone: (812) 362-4094  
 E-mail: elenasmirno@yandex.ru

1. Oleshchenko EP, Alferova EV. Lister as causative agents of food borne infections. *Health. Medical ecology. Science.* 2012;49(3-4):211-2. (In Russian).
2. Khramov MV, Kostenko YuG, Yushina YuK, Bataeva DS. Listerioz: laboratornaya diagnostika v sovremennykh usloviyakh. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2016;6(3):121. (In Russian).
3. Shcherbinin AV, Mezentsev SV, Spirkina OS. *Listeriae* in the products of meat-processing companies. *Bulletin of Altai State Agricultural University.* 2014; 8(118):101-4. (In Russian).
4. Bakulov IA, Vasil'ev DA, Kolbasov DV, et al. Listerii i listerioz [Listeria and listeriosis]. 2nd ed. Ul'yanovsk, 2016. (In Russian).
5. Farber J, Peterkin P. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev.* 1991 Sep;55(3):476-511.
6. Low J, Donachie W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet J.* 1997 Jan;153(1):9-29.
7. Painter J, Slutsker L. Listeriosis in humans. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria, Listeriosis and Food Safety.* Boca Raton, FL: CRC Press, 2007, p. 75-95.

# Молекулярное типирование штаммов *Gardnerella vaginalis*, выделенных у женщин репродуктивного возраста с верифицированным диагнозом бактериального вагиноза

Т.В.Припутневич, В.В.Муравьева, А.Е.Донников, Д.Ю.Трофимов, Г.Р.Байрамова, Е.А.Межевитинова, Л.А.Любасовская, А.Б.Гордеев, П.Р.Абакарова, Е.С.Шубина, А.Ю.Гольцов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация

Проведено молекулярное типирование 123 штаммов *Gardnerella vaginalis*, выделенных из вагинального отделяемого женщин с верифицированным диагнозом бактериального вагиноза, протекающего с клиническими проявлениями и бессимптомно. При типировании использовались особенности нуклеотидных последовательностей района межгенного спейсера (ITS), расположенного между генами 16S- и 23S-rРНК. Данный метод позволил разделить штаммы *Gardnerella vaginalis* на три подгруппы, для каждой из которых выделены специфические участки последовательностей ITS. Анализ результатов полногеномного высокопроизводительного секвенирования трех штаммов *G. vaginalis*, относящихся к трем разным подгруппам, выявил отличия в размерах генома и наборе факторов патогенности, что позволяет сделать предположение о различном уровне вирулентного потенциала штаммов, относящихся к разным подгруппам.  
**Ключевые слова:** бактериальный вагиноз, *Gardnerella vaginalis*, типирование, полногеномное секвенирование, биотипирование

**Для цитирования:** Припутневич Т.В., Муравьева В.В., Донников А.Е., Трофимов Д.Ю., Байрамова Г.Р., Межевитинова Е.А., Любасовская Л.А., Гордеев А.Б., Абакарова П.Р., Шубина Е.С., Гольцов А.Ю. Молекулярное типирование штаммов *Gardnerella vaginalis*, выделенных у женщин репродуктивного возраста с верифицированным диагнозом бактериального вагиноза. Бактериология. 2018; 3(4): 26–32. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-26-32

## Molecular typing of *Gardnerella vaginalis* strains determined in women of reproductive age with virified diagnosis of bacterial vaginosis

T.V.Priputnevich, V.V.Muravyova, A.E.Donnikov, D.Yu.Trofimov, G.R.Bayramova, E.A.Mezhevitinova, L.A.Lyubasovskaya, A.B.Gordeev, P.R.Abakarova, E.S.Shubina, A.Yu.Goltsov

National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I.Kulakova, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Molecular typing of 123 strains of *Gardnerella vaginalis* isolated from vaginal discharge of women with verified diagnosis of bacterial vaginosis, occurring with clinical manifestations and asymptomatic was carried out. The properties of nucleotide sequences in the region of intergenic spacer (ITS) located between 16S- and 23S-rRNA genes were used for typing. The method used allowed us to separate the *Gardnerella* strains into three subgroups according to specific sequences of the ITS. Analysis of the results of genome-wide high-throughput sequencing of three strains of the genome *Gardnerella vaginalis*, belonging to different subgroups, revealed differences in the length of the genomes and a set of virulence factors, which allows us to make an assumption about the different level of virulent potential of the strains belonging to different subgroups.  
**Keywords:** bacterial vaginosis, *Gardnerella vaginalis*, typing, genome-wide sequencing, biotyping

**For citation:** Priputnevich T.V., Muravyova V.V., Donnikov A.E., Trofimov D.Yu., Bayramova G.R., Mezhevitinova E.A., Lyubasovskaya L.A., Gordeev A.B., Abakarova P.R., Shubina E.S., Goltsov A.Yu. Molecular typing of *Gardnerella vaginalis* strains determined in women of reproductive age with virified diagnosis of bacterial vaginosis. Bacteriology. 2018; 3(4): 26–32. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-26-32

### Для корреспонденции:

Припутневич Татьяна Валерьевна, доктор медицинских наук, заведующая отделом микробиологии, клинической фармакологии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4  
Телефон: (495) 438-2510

Статья поступила 25.09.2018 г., принята к печати 25.12.2018 г.

### For correspondence:

Tatiana V. Priputnevich, MD, PhD, DSc, head of the department of microbiology, clinical pharmacology and epidemiology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I.Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation

Address: 4 Akademika Oparina str., Moscow, 117997, Russian Federation  
Phone: (495) 438-2510

The article was received 25.09.2018, accepted for publication 25.12.2018

**Б**актериальный вагиноз (БВ) – одна из наиболее распространенных вагинальных инфекций у женщин репродуктивного возраста. Этиологическая структура БВ представлена широким спектром облигатно-анаэробных микроорганизмов (*Fusobacterium nucleatum*, *Atopobium vaginae*, *Prevotella bivia*, *Prevotella disiens*, *Mobiluncus mulieris*, *Veillonella sp.*, *Peptostreptococcus sp.*, *Peptoniphilus sp.* и другими видами), а также микроаэрофилом – *G. vaginalis*. Последний вид – единственный микроорганизм, который в 95% случаев встречается в вагинальном биотопе женщин с диагнозом БВ, чаще в составе групп микроорганизмов, ассоциированных с БВ, реже – как моновозбудитель заболевания [1–3]. У пациенток с рецидивирующим БВ *G. vaginalis* может встречаться в 100% случаев [4]. Однако *G. vaginalis* не всегда вызывает БВ. В низких титрах возбудитель может колонизировать влагалище здоровых женщин [5, 6]. *G. vaginalis* достаточно неоднородный вид, который подразделяется на ряд подгрупп.

Одна из первых популярных схем типирования *G. vaginalis* предложена P.Piot и соавт. [7]. В соответствии с этой схемой внутри вида *G. vaginalis* различают 8 биотипов на основе трех фенотипических тестов: по липазной и бета-галактозидазной активностям, а также по гидролизу гиппурата натрия. Позже стали появляться молекулярно-генетические схемы типирования: сначала метод рестрикционного анализа амплифицированной рибосомальной ДНК (ARDRA) [8], позволяющий выявить три-четыре генотипа *G. vaginalis*, и метод произвольно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD) [9], а затем – методы, основанные на секвенировании отдельных локусов ДНК. Чаще всего проводится либо секвенирование 16S рРНК, либо секвенирование нуклеотидной последовательности шаперонина-60 (срп60) [10, 11].

Прорыв в генотипировании штаммов *G. vaginalis* стал возможен благодаря методу высокопроизводительного секвенирования, когда в ходе сравнительного анализа полных геномов разных штаммов были обнаружены значительные отличия [12, 13]. В 2012 г. показано, что универсальная часть генома *G. vaginalis* включает в себя 746 генов, составляя только 27% от полного генома [14, 15]. При построении филогенетического дерева показано наличие 4 групп штаммов (ветвей), отличающихся друг от друга размером и структурой генома, а также по GC-составу. Высказано предположение, что, возможно, целесообразно рассматривать каждую из четырех групп как отдельный вид.

В последние годы в литературе встречаются публикации о корреляции групп *G. vaginalis* со структурной организацией генома, наличием того или иного набора генов патогенности и особенностями клинического течения БВ [15–17]. В других работах, напротив, такой корреляции не отмечается [18]. Таким образом, молекулярное типирование штаммов *G. vaginalis*, анализ взаимосвязи штаммовой принадлежности к определенным подгруппам с особенностями клинического течения БВ представляется актуальной задачей.

**Цель исследования:** провести молекулярное типирование штаммов *G. vaginalis*, выделенных из вагинального отделяемого женщин репродуктивного возраста с верифицированным диагнозом БВ, протекающего с клиническими проявлениями и бессимптомно.

## Материалы и методы

В исследование включены 103 женщины репродуктивного возраста, у которых на основании комплексной микробиологической диагностики в соответствии с медицинской технологией «Интегральная оценка состояния микробиоты влагалища. Диагностика оппортунистических вагинитов» [19] верифицирован диагноз БВ. Из них 93 пациентки обратились в научно-консультативное отделение ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова» Минздрава России с жалобами на патологические выделения из половых путей: 39 – с рецидивирующим течением БВ (три и более эпизодов обострения в год) и 54 – с острым течением БВ, у которых из анамнестических данных не получено сведений о рецидиве заболевания в течение последнего года; 10 женщин с бессимптомным течением БВ обратились по поводу предгравидарной подготовки. Пациенткам выполнено культуральное исследование в условиях пониженного содержания кислорода и анаэробных условиях. Суммарно выделено 123 штамма *G. vaginalis*.

В работе использовали стандартные питательные среды и условия культивирования, адаптированные для *G. vaginalis*. Вагинальное отделяемое с использованием метода истощающего штриха засеивали на агар Columbia с добавлением 5% бараньей крови (Bio-Rad, США) с последующим культивированием в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора (Shel Lab, США) или анаэробного бокса (Jouan, Франция) в атмосфере трехкомпонентной газовой смеси (N<sub>2</sub> – 80%, CO<sub>2</sub> – 10%, H<sub>2</sub> – 10%), а также на прeredуцированный агар Schaedler (Conda, Испания) с 5% крови человека в атмосфере трехкомпонентной газовой смеси (N<sub>2</sub> – 80%, CO<sub>2</sub> – 10%, H<sub>2</sub> – 10%) при 37°C в течение 48 ч.

Видовую идентификацию выделенных культур проводили с помощью метода MALDI-TOF-MS на масс-спектрометре Autoflex III с программным обеспечением MALDI Biotyper версии 3.0 (Bruker Daltonics, Германия) [20].

Биотипирование *G. vaginalis* проводили по методике, предложенной P.Piot и соавт. [21], позволяющей на основе трех тестов (оценке липазной и β-галактозидазной активности и гидролизу гиппурата) дифференцировать *G. vaginalis* на 8 биотипов.

Для обнаружения продукции β-галактозидазы использовали ONP-тест (ОНП-тест) (ERBA LACHEMA, Чехия). β-Галактозидаза, экспрессируемая *G. vaginalis*, гидролизует ONP-субстрат (о-нитрофенил β-D-галактопиранозид) с высвобождением желтого хромогенного соединения о-нитрофенола.

Для индикации гидролиза гиппурата натрия применяли Гиппурат-тест (ERBA LACHEMA, Чехия). *G. vaginalis* может вызывать гидролиз гиппурата натрия (1% водный раствор) с образованием глицина и бензоата натрия. Глицин дезаминируется окисляющим реагентом нингидрином, что сопровождается пурпурным окрашиванием.

Тест на продукцию липазы проводили на поверхности питательного агара (основа агара Schaedler) с добавлением после автоклавирования 10 мл эмульсии яичного желтка (HiMedia, Индия). После культивирования *G. vaginalis* оценивали в косом свете наличие маслянистого блеска в зоне роста культуры.

Молекулярное типирование штаммов *G. vaginalis* осуществляли с помощью тест-системы собственной разработ-

Таблица 1. Результаты полногеномного секвенирования и сборки геномов

№ штамма	Количество коротких чтений	Количество контигов >1000 п.н.	Длина генома (п.н.)	N90 (п.н.)	Кратность покрытия
1	1060502	56	1,73 млн	18544	55x
2	1185029	64	1,59 млн	12850	44x
3	1559008	37	1,56 млн	19931	101x

ки, основанной на методе ПЦР в режиме «реального времени». При разработке тест-системы учитывали специфические участки нуклеотидных последовательностей района межгенного спейсера (ITS), расположенного между генами 16S- и 23S-rPHK. Для поиска гомологичных последовательностей использовали опубликованную на ресурсе NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) последовательность рДНК *G. vaginalis* L08167.1. Поиск проводили с помощью программы BLAST [22]. Отобранные последовательности рДНК *G. vaginalis* выравнивали с помощью программы MEGA ([http://www.megasoftware.net/mega4/m\\_creating.html](http://www.megasoftware.net/mega4/m_creating.html)). Специфические для трех подгрупп участки нуклеотидных последовательностей района межгенного спейсера (ITS) использовали для размещения праймеров. Параметры выбранных олигонуклеотидов оценивали с помощью программы Oligo 4 (<http://www.oligo.net/>).

Полногеномное секвенирование штаммов *G. vaginalis* проводили на секвенаторе Ion PGM Torrent с наборами Ion Sequencing Kit (Life Technologies Thermo Fisher, США) по протоколу производителя. Геномную ДНК выделяли после лизиса лизоцимом и протеиназой K, а также дальнейшей очисткой ДНК фенол-хлороформной экстракцией. Библиотеки ДНК готовили с помощью наборов Ion Xpress Plus Fragment Library Kit и Ion Xpress Barcode adapters 1-16 (Life Technologies Thermo Fisher, США). Проверку качества библиотек проводили на приборе Bioanalyzer 2100 с наборами High Sensitivity DNA kit (Agilent Technologies, США). Постановку эмульсионной ПЦР и обогащение сфер проводили с наборами Ion OneTouch Template Kit (Life Technologies Thermo Fisher, США).

Сборку коротких чтений осуществляли с помощью программного обеспечения Mira3. При сборке использовали следующие параметры: «genome, de novo, accurate». Результаты сборки геномов представлены в таблице 1.

Поиск генов патогенности осуществляли с помощью программы BLAST [22] путем сравнения нуклеотидных последовательностей геномов с последовательностями генов патогенности, взятыми из базы данных NCBI GenBank [23]. Набор генов патогенности определялся генами, представленными в работе С.Д.Уотан и соавт. [13].

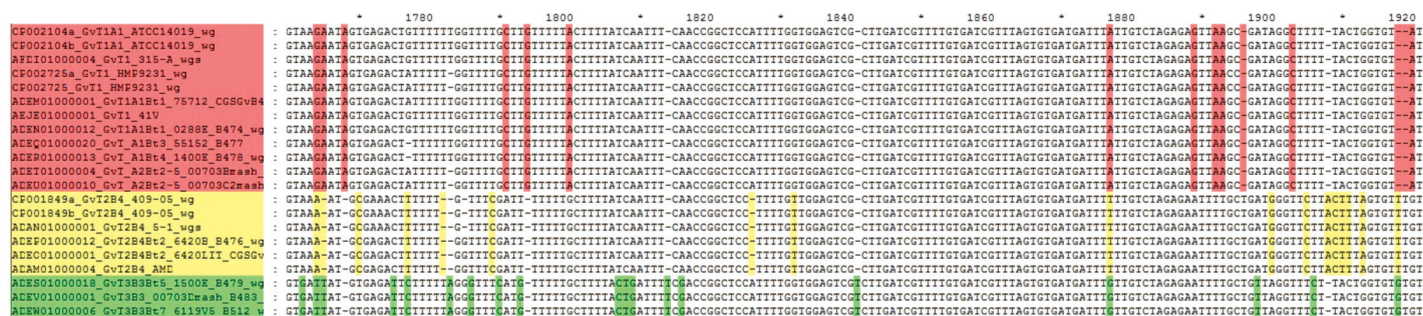


Рисунок. Выравнивание последовательностей рДНК *G. vaginalis*.

Специфические для каждой подгруппы участки выделены цветом: подгруппа I – красный; подгруппа II – желтый; подгруппа III – зеленый.

## Результаты и обсуждение

Анализ нуклеотидных последовательностей района межгенного спейсера (ITS), расположенного между генами 16S- и 23S-rPHK, доступных на ресурсе NCBI, выявил три подгруппы *G. vaginalis*. Для каждой подгруппы были выделены специфические участки последовательностей ITS, представленные на рисунке. Исходя из полученной информации о специфических участках ITS, подобраны три пары праймеров и разработана собственная тест-система для типирования *G. vaginalis*, основанная на методе ПЦР в режиме реального времени.

С помощью разработанного метода проведено молекулярное типирование 123 штаммов *G. vaginalis*, выделенных из вагинального отделяемого пациенток с подтвержденным диагнозом БВ. В зависимости от особенностей специфических участков последовательностей ITS установлено, что наиболее часто встречались штаммы, принадлежащие к I подгруппе (93 штамма), реже – к подгруппам II и III (24 и 6 штаммов соответственно).

Анализ частоты встречаемости штаммов *G. vaginalis* указанных подгрупп среди пациенток с различным течением БВ показал, что у пациенток с острым течением БВ абсолютно доминирующей была подгруппа I *G. vaginalis* (92,6%), в том числе в двух случаях (3,7%) – в сочетании с подгруппой II, не встречавшейся изолированно. *G. vaginalis* подгруппы III обнаружена у четырех пациенток (7,4%). Таким образом, при остром течении БВ *G. vaginalis* в 100% случаев представлена подгруппами I и III, отличающимися большим набором факторов патогенности. *G. vaginalis* подгруппы II у пациенток с острым БВ встречалась редко и всегда ассоциировалась с подгруппой I.

У женщин с бессимптомным течением БВ, обследованных в связи с подготовкой к беременности, при культуральном исследовании суммарно получено 10 изолятов *G. vaginalis*. Генотипирование показало, что все изоляты принадлежали к подгруппе II.

Анализ причин обращения пациенток с рецидивирующим БВ к врачу показал, что в 45 случаях поводом для посещения врача было обострение (рецидив) заболевания, под-

Таблица 2. Различия в наборе генов патогенности у трех разных подгрупп *G. vaginalis*

Продукт гена	Подгруппа I (штамм №1)	Подгруппа II (штамм №2)	Подгруппа III (штамм №3)
<b>Цитотоксичность</b>			
Вагинолизин	+	+	+
Гемолизин из семейства TlyA	+	+	+
Прекурсор сиалидазы A	+	-	+
α-L-Фукозидаза	+	-	-
β-Галактозидаза	+	-	-
α-Маннозидаза	+	-	-
O-Сиалогликопротеин-эндопептидаза	+	+	+
Гликопротеаза из семейства M22	+	+	+
<b>Резистентность</b>			
Эффлюксная пермеаза множественной устойчивости к лекарственным препаратам, из семейства MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion / Выведение лекарственных препаратов и токсичных соединений)	+	+	+
Резистентность к антибиотикам	+	-	+
Белок резистентности к метициллину	+	-	-
Антипортер множественной устойчивости к лекарственным препаратам	+	+	+
ABC-транспортер 532 множественной устойчивости (ATP-binding cassette / АТФ-связывающая кассета)	+	+	+
ABC-транспортер множественной устойчивости	+	+	+
Блеомицингидролаза	+	+	+
Аминогликозид-фосфотрансфераза	+	-	-
Белок из семейства DedA	+	+	+
<b>Формирование биопленок</b>			
Гликозилтрансфераза 1 из семейства 1	+	+	+
Гликозилтрансфераза 2 из семейства 1	-	+	-
Гликозилтрансфераза 1 из семейства 2	+	+	+
Гликозилтрансфераза 2 из семейства 2	+	+	+
Гликозилтрансфераза 3 из семейства 2	-	+	-
Гликозилтрансфераза 4 из семейства 2	-	+	-
Гликозилтрансфераза 5 из семейства 2	+	-	+
Гликозилтрансфераза 6 из семейства 2	+	-	-
Гликозилтрансфераза 7 из семейства 2	+	-	-
Гликозилтрансфераза 8 из семейства 2	+	-	-
Гликозилтрансфераза из семейства 4	+	+	+
Гликозилтрансфераза	+	+	+
<b>Защита от иммунного ответа</b>			
Белок клеточной поверхности из семейства Rib	+	-	-
<b>Адгезия к эпителиальным клеткам</b>			
Прекурсоры фимбрий, тип 1	+	+	+
Прекурсоры фимбрий, тип 2	+	+	+

твержденное результатами клинико-лабораторного обследования. Обращает на себя внимание тот факт, что все случаи рецидива БВ ассоциировались с подгруппами *G. vaginalis* I и III. В 12 случаях визит к врачу был связан с плановым обследованием на фоне динамического наблюдения, в соответствии с алгоритмом ведения женщин с рецидивирующим БВ. Пациентки не предъявляли каких-либо жалоб, клинически не отмечено манифестации заболевания. Однако по результатам комплексной микробиологической диагностики состояние вагинального микроценоза соответствовало критериям БВ или мезоценоза (состояния микробиоты влагалища, промежуточного между нормоценозом и БВ). Во всех 12 случаях выявлена только II подгруппа *G. vaginalis*. Таким образом, все эпизоды обострения БВ были связаны с наличием *G. vaginalis* I и III подгрупп, а бессимптомные эпизоды ассоциировались с наличием *G. vaginalis* II подгруппы.

Из каждой подгруппы было взято по одному штамму ( $n = 3$ ), для которых выполнено полногеномное высокопроизводительное секвенирование. В результате секвенирования образцов получено 1 060 502–1 559 008 ридов с медианой длины рида около 110 п.н. (табл. 1). После сборки в контиги итоговая длина генома получилась примерно одинаковой для штаммов подгрупп II и III и несколько длиннее для штамма, относящегося к подгруппе I.

Для *G. vaginalis* описано несколько групп факторов, ответственных за патогенность: адгезия к эпителиальным клеткам, продукция токсинов, резистентность к антибиотикам, защита от иммунного ответа клеток хозяина, способность формировать биопленки. У всех трех штаммов проверено наличие описанных генов. Результаты приведены ниже (табл. 2). Для штамма из подгруппы I обнаружен больший набор генов, отвечающих за цитотоксичность, чем в двух других штаммах. Ген предшественника сиалидазы A, который часто описывают как один из основных факторов вирулентности, присутствует в штаммах из подгрупп I и III и отсутствует у штамма из подгруппы II. А гены, кодирующие фукозидазу, галактозидазу и маннозидазу, присутствуют только в геноме штамма из подгруппы I. В целом наибольшим набором генов патогенности обладает штамм, относящийся к подгруппе I, наименьшим набором – штамм из подгруппы II. Штамм, относящийся к подгруппе III, содержит промежуточное число генов патогенности.

Проведено биотипирование всех изучаемых штаммов *G. vaginalis*. Результаты представлены в таблице 3. Установлено, что наиболее часто выявляли II, IV, III, I и V биотипы *G. vaginalis* (31,7; 19,5; 15,5; 14,6 и 12,2% соответственно).

Таблица 3. Частота встречаемости различных биотипов среди изолятов *G. vaginalis*

Биотип	Частота встречаемости среди различных генотипов (абс./%)			Всего ( $n = 123$ )
	подгруппа I ( $n = 93$ )	подгруппа II ( $n = 24$ )	подгруппа III ( $n = 6$ )	
I	16/17,2	2/8,3	0	18/14,6
II	27/29,0	10/41,7	2/33,3	39/31,7
III	11/11,8	7/29,2	1/16,7	19/15,5
IV	21/22,6	3/12,5	0	24/19,5
V	11/11,8	2/8,3	2/33,3	15/12,2
VI	3/3,2	0	1/16,7	4/3,3
VII	1/1,1	0	0	1/0,8
VIII	2/2,2	0	0	2/1,6

Остальные биотипы (VI, VII, VIII) встречались редко (не более 3,3%).

Полученные результаты свидетельствуют о гетерогенности штаммов *G. vaginalis*. По данным литературы, *G. vaginalis* – филогенетически неоднородный микроорганизм. Различные методы молекулярного типирования позволяют выявить 3–4 группы штаммов *G. vaginalis*. В данной работе для типирования использовались специфические участки последовательностей межгенного спейсера (ITS), расположенного между генами 16S- и 23S-рРНК, которые позволили разделить штаммы *G. vaginalis* на три подгруппы, встречающиеся с различной частотой. Обнаружены штаммы, относящиеся к каждой из трех подгрупп, причем различные подгруппы обладали разной частотой встречаемости. Чаще всего выявляли штаммы, относящиеся к подгруппе I, реже – штаммы из подгруппы III.

Анализ частоты встречаемости различных биотипов среди штаммов *G. vaginalis*, относящихся к подгруппам I–III, показал, что чаще других выявляли II биотип, однако не отмечено достоверной разницы в частоте встречаемости этого биотипа среди штаммов I–III подгрупп. Вторую позицию занимает III биотип, который несколько чаще обнаруживали среди штаммов, относящихся к подгруппе II (41,7%). Остальные биотипы встречались реже и без достоверного различия их распространения в подгруппах штаммов разной генетической принадлежности. Таким образом, четкой корреляции между отдельными биотипами и генотипами не выявлено.

Сравнение набора генов патогенности в геномах представителей каждой из трех подгрупп показало, что наибольшим набором генов патогенности обладает штамм, относящийся к подгруппе I, наименьшим – штамм из подгруппы II. Кроме того, длина генома штамма из подгруппы I несколько больше, чем у штаммов из подгрупп II и III. Можно предположить, что штаммы, относящиеся к подгруппам I и III, обладают более высоким вирулентным потенциалом. Обнаружение штаммов *G. vaginalis* I и III подгрупп только у пациенток с острым течением БВ или при обострении рецидивирующего БВ является косвенным тому подтверждением. Однако данное предположение нуждается в проверке.

Учитывая весьма слабую изученность генетического полиморфизма штаммов *G. vaginalis*, выделенных из вагинального отделяемого женщин с верифицированным диагнозом БВ в Российской Федерации, полученные результаты вносят определенный вклад в решение данного вопроса.

## Литература

- Catlin BW. *Gardnerella vaginalis*: characteristics, clinical considerations, and controversies. Clin Microbiol Rev. 1992 Jul;5(3):213-37.
- Menard J-P, Mazouni C, Salem-Cherif I, Fenollar F, Raoult D, Boubli L et al. High vaginal concentrations of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* in women undergoing preterm labor. Obstet Gynecol. 2010 Jan;115(1):134-40. DOI: 10.1097/AOG.0b013e3181c391d7
- Карапетян ТЭ, Анкирская АС, Муравьева ВВ. Бактериальный вагиноз в первом триместре беременности. Медицинский совет. 2015;20:68-71.
- Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, Morton AN, Rudland E, Garland SM. The association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy. J Infect Dis. 2006 Sep 15;194(6):828-36. DOI: 10.1086/506621

- Gardner HL, Duker CH. Haemophilus vaginalis vaginitis: a newly defined specific infection previously classified as 'nonspecific' vaginitis. Am J Obstet Gynecol. 1955 May;69(5):962-76.
- Kim TK, Thomas SM, Ho M, Sharma S, Reich CI, Frank JA, et al. Heterogeneity of vaginal microbial communities within individuals. J Clin Microbiol. 2009 Apr;47(4):1181-9. DOI: 10.1128/JCM.00854-08.
- Piot P, Van Dyck E, Peeters M, Hale J, Totten PA, Holmes KK. Biotypes of *Gardnerella vaginalis*. J. Clin. Microbiol. 1984;20:667-79.
- Pleckaityte M, Janulaitiene M, Lasickiene R, Zvirbliene A. Genetic and biochemical diversity of *Gardnerella vaginalis* strains isolated from women with bacterial vaginosis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012 Jun;65(1):69-77. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.00940.x
- El Aila NA, Tency I, Claeys G, Verstraelen H, Saerens B, Santiago GL, et al. Identification and genotyping of bacteria from paired vaginal and rectal samples from pregnant women indicates similarity between vaginal and rectal microflora. BMC Infect Dis. 2009 Oct 14;9:167. DOI: 10.1186/1471-2334-9-167.
- Hummelen R, Fernandes AD, Macklaim JM, Dickson RJ, Changalucha J, Gloor GB, et al. Deep sequencing of the vaginal microbiota of women with HIV. PLoS One. 2010 Aug 12;5(8):e12078. DOI: 10.1371/journal.pone.0012078.
- Hill JE, Goh SH, Money DM, Doyle M, Li A, Crosby WL, et al. Characterization of vaginal microflora of healthy, nonpregnant women by chaperonin-60 sequence based methods. Am J Obstet Gynecol. 2005 Sep;193(3 Pt 1):682-92. DOI: 10.1016/j.ajog.2005.02.094
- Harwich MD Jr, Alves JM, Buck GA, Strauss JF, Patterson JL, Oki AT, et al. Drawing the line between commensal and pathogenic *Gardnerella vaginalis* through genome analysis and virulence studies. BMC Genomics. 2010 Jun 11; 11:375. DOI: 10.1186/1471-2164-11-375.
- Yeoman CJ, Yildirim S, Thomas SM, Durkin AS, Torralba M, Sutton G, et al. Comparative genomics of *Gardnerella vaginalis* strains reveals substantial differences in metabolic and virulence potential. PLoS One. 2010 Aug 26;5(8):e12411. DOI: 10.1371/journal.pone.0012411.
- Ahmed A, Earl J, Retchless A, Hillier SL, Rabe LK, Chernes TL, et al. Comparative genomic analyses of 17 clinical isolates of *Gardnerella vaginalis* provide evidence of multiple genetically isolated clades consistent with speciation into genovars. J Bacteriol. 2012 Aug;194(15):3922-37. DOI: 10.1128/JB.00056-12
- Balashov SV, Mordechai E, Adelson ME, Gyax SE. Identification, quantification and subtyping of *Gardnerella vaginalis* in noncultured clinical vaginal samples by quantitative PCR. J Med Microbiol. 2014 Feb;63(Pt 2):162-75. DOI: 10.1099/jmm.0.066407-0.
- Schuyler JA, Mordechai E, Adelson ME, Sobel JD, Gyax SE, Hilbert DW. Identification of intrinsically metronidazole-resistant clades of *Gardnerella vaginalis*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016 Jan;84(1):1-3. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.10.006
- Janulaitiene M, Paliulyte V, Grinceviciene S, Zakareviciene J, Vladisauskiene A, Marcinkute A, et al. Prevalence and distribution of *Gardnerella vaginalis* subgroups in women with and without bacterial vaginosis. BMC Infect Dis. 2017 Jun 5; 17(1):394. DOI: 10.1186/s12879-017-2501-y.
- Hilbert DW, Schuyler JA, Adelson ME, Mordechai E, Sobel JD, Gyax SE. *Gardnerella vaginalis* population dynamics in bacterial vaginosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2017 Jul;36(7):1269-1278. DOI: 10.1007/s10096-017-2933-8
- Анкирская АС, Муравьева ВВ. Интегральная оценка состояния микробиоты влагалища. Диагностика оппортунистических вагинитов (медицинская технология). М., 2011.
- Припутневич ТВ, Мелкумян АР. Масс-спектрометрия – новое слово в клинической микробиологии. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61(12):842-8. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-12-842-848
- Piot P, Van Dyck E, Peeters M, Hale J, Totten PA, Holmes KK. Biotypes of *Gardnerella vaginalis*. J Clin Microbiol. 1984;20:667-79.

22. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215:403-10.
23. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D36-42. DOI: 10.1093/nar/gks1195

## References

1. Catlin BW. *Gardnerella vaginalis*: characteristics, clinical considerations, and controversies. *Clin Microbiol Rev.* 1992 Jul;5(3):213-37.
2. Menard J-P, Mazouni C, Salem-Cherif I, Fenollar F, Raoult D, Boubli L et al. High vaginal concentrations of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* in women undergoing preterm labor. *Obstet Gynecol.* 2010 Jan;115(1):134-40. DOI: 10.1097/AOG.0b013e3181c391d7
3. Karapetyan TE, Ankirskaya AS, Muravyova VV. Bacterial vaginosis in the first trimester of pregnancy. *Meditsinskiy Sovet (Medical Council).* 2015;20:68-71. (In Russian).
4. Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, Morton AN, Rudland E, Garland SM. The association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy. *J Infect Dis.* 2006 Sep 15;194(6):828-36. DOI: 10.1086/506621
5. Gardner HL, Dukes CH. Haemophilus vaginalis vaginitis: a newly defined specific infection previously classified as 'nonspecific' vaginitis. *Am J Obstet Gynecol.* 1955 May;69(5):962-76.
6. Kim TK, Thomas SM, Ho M, Sharma S, Reich CI, Frank JA, et al. Heterogeneity of vaginal microbial communities within individuals. *J Clin Microbiol.* 2009 Apr;47(4):1181-9. DOI: 10.1128/JCM.00854-08.
7. Piot P, Van Dyck E, Peeters M, Hale J, Totten PA, Holmes KK. Biotypes of *Gardnerella vaginalis*. *J. Clin. Microbiol.* 1984;20:667-79.
8. Pleckaityte M, Janulaitiene M, Lasickiene R, Zvirbliene A. Genetic and biochemical diversity of *Gardnerella vaginalis* strains isolated from women with bacterial vaginosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012 Jun;65(1):69-77. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.00940.x
9. El Aila NA, Tency I, Claeys G, Verstraelen H, Saerens B, Santiago GL, et al. Identification and genotyping of bacteria from paired vaginal and rectal samples from pregnant women indicates similarity between vaginal and rectal microflora. *BMC Infect Dis.* 2009 Oct 14;9:167. DOI: 10.1186/1471-2334-9-167.
10. Hummelen R, Fernandes AD, Macklaim JM, Dickson RJ, Changalucha J, Gloor GB, et al. Deep sequencing of the vaginal microbiota of women with HIV. *PLoS One.* 2010 Aug 12;5(8):e12078. DOI: 10.1371/journal.pone.0012078.
11. Hill JE, Goh SH, Money DM, Doyle M, Li A, Crosby WL, et al. Characterization of vaginal microflora of healthy, nonpregnant women by chaperonin-60 sequence based methods. *Am J Obstet Gynecol.* 2005 Sep;193(3 Pt 1):682-92. DOI: 10.1016/j.ajog.2005.02.094
12. Harwich MD Jr, Alves JM, Buck GA, Strauss JF, Patterson JL, Oki AT, et al. Drawing the line between commensal and pathogenic *Gardnerella vaginalis* through genome analysis and virulence studies. *BMC Genomics.* 2010 Jun 11;11:375. DOI: 10.1186/1471-2164-11-375.
13. Yeoman CJ, Yildirim S, Thomas SM, Durkin AS, Torralba M, Sutton G, et al. Comparative genomics of *Gardnerella vaginalis* strains reveals substantial differences in metabolic and virulence potential. *PLoS One.* 2010 Aug 26;5(8):e12411. DOI: 10.1371/journal.pone.0012411.
14. Ahmed A, Earl J, Retchless A, Hillier SL, Rabe LK, Chernes TL, et al. Comparative genomic analyses of 17 clinical isolates of *Gardnerella vaginalis* provide evidence of multiple genetically isolated clades consistent with subspeciation into genovars. *J Bacteriol.* 2012 Aug;194(15):3922-37. DOI: 10.1128/JB.00056-12
15. Balashov SV, Mordechai E, Adelson ME, Gyax SE. Identification, quantification and subtyping of *Gardnerella vaginalis* in noncultured clinical vaginal samples by quantitative PCR. *J Med Microbiol.* 2014 Feb;63(Pt 2):162-75. DOI: 10.1099/jmm.0.066407-0.

16. Schuyler JA, Mordechai E, Adelson ME, Sobel JD, Gyax SE, Hilbert DW. Identification of intrinsically metronidazole-resistant clades of *Gardnerella vaginalis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016 Jan;84(1):1-3. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.10.006
17. Janulaitiene M, Paliulyte V, Grinceviciene S, Zakareviciene J, Vladisauksiene A, Marcinkute A, et al. Prevalence and distribution of *Gardnerella vaginalis* subgroups in women with and without bacterial vaginosis. *BMC Infect Dis.* 2017 Jun 5; 17(1):394. DOI: 10.1186/s12879-017-2501-y.
18. Hilbert DW, Schuyler JA, Adelson ME, Mordechai E, Sobel JD, Gyax SE. *Gardnerella vaginalis* population dynamics in bacterial vaginosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017 Jul;36(7):1269-1278. DOI: 10.1007/s10096-017-2933-8
19. Ankirskaya AS, Murav'eva VV. Integral'naya otsenka sostoyaniya mikrobyoty vlagalishcha. *Diagnostika opportunisticheskikh vaginitov (meditsinskaya tekhnologiya).* Moscow, 2011. (In Russian).
20. Pripitnevich TM, Melkumyan AR. The mass-spectrometry as a new word in clinical microbiology. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics.* 2016;61(12):842-8. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-12-842-848 (In Russian).
21. Piot P, Van Dyck E, Peeters M, Hale J, Totten PA, Holmes KK. Biotypes of *Gardnerella vaginalis*. *J Clin Microbiol.* 1984;20:667-79.
22. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215:403-10.
23. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D36-42. DOI: 10.1093/nar/gks1195

---

## Информация об авторах:

Муравьева Вера Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии отдела микробиологии, клинической фармакологии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4  
Телефон: (495) 438-2510

Донников Андрей Евгеньевич, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией молекулярно-генетических методов Института репродуктивной генетики ФГБУ «Национальный исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4  
Телефон: (495) 438-4951

Трофимов Дмитрий Юрьевич, доктор биологических наук, директор Института репродуктивной генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4  
Телефон: (495) 438-4951

Байрамова Гюльдана Рауфовна, доктор медицинских наук, заведующая по клинической работе научно-поликлиническим отделением ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4  
Телефон: (495) 438-1866

Межевитинова Елена Анатольевна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник научно-поликлинического отделения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4  
Телефон: (495) 438-7747

Любасовская Людмила Анатольевна, кандидат медицинских наук, заведующая отделением клинической фармакологии отдела микробиологии, клинической фармакологии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4  
Телефон: (495) 438-2510



Гордеев Алексей Борисович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии отдела микробиологии, клинической фармакологии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4  
Телефон: (495) 438-2510

Абакарова Патимат Рапиевна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник научно-поликлинического отделения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4  
Телефон: (495) 438-7747

Шубина Екатерина Сергеевна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией биоинформатического анализа геномных данных Института репродуктивной генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4  
Телефон: (495) 438-4951

Гольцов Андрей Юрьевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией биоинформатического анализа геномных данных Института репродуктивной генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Адрес: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4  
Телефон: (495) 438-4951

**Information about authors:**

Vera V. Muravieva, PhD (Biology), senior researcher, Laboratory of microbiology, Department of microbiology, clinical pharmacology and epidemiology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I.Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation  
Address: 4 Akademika Oparina str., Moscow, 117997, Russian Federation  
Phone: (495) 438-2510

Andrey E. Donnikov, MD, PhD, head of the laboratory of molecular genetic methods, Institute of reproductive genetics, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I.Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation  
Address: 4 Akademika Oparina str., Moscow, 117997, Russian Federation  
Phone: (495) 438-4951

Dmitry Yu. Trofimov, PhD, DSc (Biology), Director of the laboratory of the molecular genetic methods, Institute of reproductive genetics, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I.Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation  
Address: 4 Akademika Oparina str., Moscow, 117997, Russian Federation  
Phone: (495) 438-4951

Gyuldana R. Bairamova, MD, PhD, DSc, head of the clinical department scientific-polyclinic unit, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I.Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation  
Address: 4 Akademika Oparina str., Moscow, 117997, Russian Federation  
Phone: (495) 438-2510

Elena A. Mezhevitinova, MD, PhD, DSc leader researcher, scientific-polyclinic unit, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I.Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation  
Address: 4 Akademika Oparina str., Moscow, 117997, Russian Federation  
Phone: (495) 438-2510

Lyudmila A. Lyubasovskaya, MD, PhD, head of the unit of pharmacology, department of microbiology, clinical pharmacology and epidemiology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I.Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation  
Address: 4 Akademika Oparina str., Moscow, 117997, Russian Federation  
Phone: (495) 438-2510

Alexey B. Gordeev, PhD (Biology), senior researcher, Laboratory of microbiology, Department of microbiology, clinical pharmacology and epidemiology, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I.Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation  
Address: 4 Akademika Oparina str., Moscow, 117997, Russian Federation  
Phone: (495) 438-2510

Patimat R. Abakarova, MD, PhD, researcher, scientific-polyclinic Unit, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I.Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation  
Address: 4 Akademika Oparina str., Moscow, 117997, Russian Federation  
Phone: (495) 438-7747

Yekaterina S. Shubina, PhD (Biology), head of the laboratory of the molecular genetic methods, Institute of reproductive genetics, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I.Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation  
Address: 4 Akademika Oparina str., Moscow, 117997, Russian Federation  
Phone: (495) 438-4951

Andrey Y. Goltsov, PhD (Biology), researcher, laboratory of the molecular genetic methods, Institute of reproductive genetics, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I.Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation  
Address: 4 Akademika Oparina str., Moscow, 117997, Russian Federation  
Phone: (495) 438-4951

**НОВОСТИ НАУКИ**

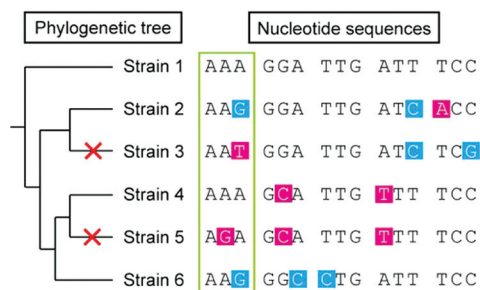
**Анализ выявляет ключевой ген бактериальной инфекции**

Ученые дали новую надежду в борьбе с бактериями, устойчивыми к антибиотикам, выявив генетический фактор, который важен для вирулентности *Streptococcus pneumoniae*. Эта бактерия вызывает сепсис, пневмонию и менингит и представляет серьезную угрозу для общественного здравоохранения во всем мире. При помощи молекулярно-эволюционного анализа последовательностей генов попытались идентифицировать ген, не подверженный мутациям, предполагая, что это важно для инфекции/размножения этой бактерии.

Было показано, что ген *cbpJ* помогает бактериям избежать обнаружения и очистки нейтрофилами.

Тот факт, что ген *cbpJ* находится под строгим отрицательным селективным давлением, делает его особенно привлекательной мишенью для лекарств, так как это давление будет ограничивать вероятность появления устойчивых к лекарствам мутантов. Это исследование также показывает ценность молекулярно-эволюционного анализа для выявления новых лекарственных мишеней, в том числе среди факторов пневмококковой вирулентности, особенно в сочетании с традиционными молекулярно-микробиологическими подходами.

A. Phylogenetic relationship before natural selection



B. Real population resulting from natural selection



Analysis reveals key gene for bacterial infection [Electronic resource].  
URL: <https://phys.org/news/2019-03-analysis-reveals-key-gene-bacterial.html>

# Культуральный метод в лабораторной диагностике гнойных бактериальных менингитов

Л.В.Домотенко, Я.В.Подкопаев, Т.П.Морозова, И.С.Косилова, А.П.Шепелин

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

Проведен сравнительный анализ чувствительности различных методов выявления основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов (ГБМ): микроскопии, культурального метода, латекс-агглютинации и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Показано, что одним из возможных путей повышения качества культурального метода диагностики ГБМ является стандартизация преаналитического и аналитического этапов исследования за счет использования высокоэффективных коммерческих питательных сред.

**Ключевые слова:** гнойные бактериальные менингиты, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, питательные среды, лабораторная диагностика

**Для цитирования:** Домотенко Л.В., Подкопаев Я.В., Морозова Т.П., Косилова И.С., Шепелин А.П. Культуральный метод в лабораторной диагностике гнойных бактериальных менингитов. Бактериология. 2018; 3(4): 33–40. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-33-40

## Cultural method in laboratory diagnostics of purulent bacterial meningitis

L.V.Domotenko, Ya.V.Podkopaev, T.P.Morozova, I.S.Kosilova, A.P.Shepelin

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

A comparative analysis of the sensitivity of various methods for the detection of the main causative agents of GBM was carried out: microscopy, culture method, latex agglutination and PCR. It is shown that one of the possible ways to improve the quality of the culture method of diagnosing GBM is standardization of the pre-analytical and analytical stages of the study by using of highly efficient commercial nutrient media.

**Keywords:** bacterial meningitis, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, nutrient media, laboratory diagnostics

**For citation:** Domotenko L.V., Podkopaev Ya.V., Morozova T.P., Kosilova I.S., Shepelin A.P. Cultural method in laboratory diagnostics of purulent bacterial meningitis. Bacteriology. 2018; 3(4): 33–40. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-33-40

Гнойные бактериальные менингиты (ГБМ) являются одной из наиболее тяжелых форм инфекционной патологии и занимают основное место среди нейроинфекций [1]. Актуальность проблемы ГБМ определяется повсеместным распространением заболеваний, вовлечением в эпидемический процесс лиц всех возрастных групп с преимущественным поражением детей, тяжелейшим симптомокомплексом клинических проявлений, высокой вероятностью постинфекционных осложнений и значительным уровнем летальности [2].

Основной особенностью бактериальных менингитов является полиэтиологичность возбудителей, и определение этиологического агента является приоритетной процедурой при организации системы эпидемиологического наблюдения, лечения, выбора тактики проведения профилактических и противоэпидемических мероприятий [2, 3].

Наибольшую значимость в этиологической структуре ГБМ представляют менингококк, пневмококк, гемофильная палочка, стрептококк группы В, стафилококк, листерии и кишечная палочка [4, 5]. За последние годы в структуре ГБМ суще-

### Для корреспонденции:

Домотенко Любовь Викторовна, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: domotenko@obolensk.org

Статья поступила 23.10.2018 г., принята к печати 25.12.2018 г.

### For correspondence:

Lubov V. Domotenko, PhD (Chem), Leading Researcher of the Laboratory of Culture Media of the laboratory of culture media development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

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

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: domotenko@obolensk.org

The article was received 23.10.2018, accepted for publication 25.12.2018

ственно вырос удельный вес *Klebsiella pneumoniae* и других возбудителей.

Но преобладающими патогенами, которые вызывают бактериальный менингит большинства пациентов всех возрастов в большинстве регионов мира, по-прежнему остаются *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae b*. На их долю приходится от 60 до 90% всех случаев ГБМ [3, 6, 7]. Несмотря на совершенствование методов диагностики, по разным оценкам, от 13,7 до 37,0% бактериальных менингитов остаются нерасшифрованными [8, 9].

Для лабораторной диагностики ГБМ используются различные методы: микроскопический, культуральный, серологический и молекулярный. Использование каждого из них имеет ряд преимуществ и недостатков, определяемых чувствительностью, специфическими особенностями, возможностями использования коммерческих препаратов, стандартностью и другими факторами.

**Цель данной работы** – провести сравнительный анализ различных методов выявления основных возбудителей ГБМ и определить возможные пути повышения качества культурального метода при диагностике ГБМ.

Развитие молекулярных методов и их высокая специфичность приводят к приоритетному использованию их при диагностике некоторых инфекционных болезней, в частности вирусного менингита [10]. С бактериальными менингитами ситуация несколько иная. «Золотым стандартом» для диагностики и исследования чувствительности возбудителя ГБМ считают культуральный метод, поскольку только наличие патогена достоверно подтверждает наличие инфекции. Окрашивание по Граму, латексная агглютинация и полимеразная цепная реакция (ПЦР) являются дополнительными диагностическими инструментами, которые могут помочь в этиологической диагностике, особенно для пациентов с отрицательными результатами культурального метода [6, 11, 12].

**Окраска по Граму** спинномозговой жидкости – быстрый и недорогой метод, характеризуется высокой специфичностью (97–100%). Метод позволяет быстро и точно идентифицировать бактерии у 60–90% пациентов с ГБМ [13]. Отмечается, что вероятность визуализации бактерий при окраске мазка по Граму коррелирует с концентрацией бактерий в спинномозговой жидкости: при концентрации  $10^3$  КОЕ/мл и ниже положительные результаты отмечаются в 25%, при  $10^3$ – $10^5$  КОЕ/мл – в 60%, а выше  $10^5$  КОЕ/мл – в 97% случаев. Получение положительных результатов данным методом зависит от бактериального патогена, вызвавшего менингит: в 90% случаев ГБМ, вызванного *S. pneumoniae*, в 86% – *H. influenzae*, в 75% – *N. meningitidis*, в 50% – граммотрицательными бактериями и примерно в 25–35% случаев – *L. monocytogenes*. Начатое до взятия материала лечение антибактериальными препаратами снижает примерно на 20% результативность исследования [14].

**Латексная агглютинация**, получившая широкое распространение для быстрой этиологической диагностики ГБМ, проста для выполнения, не требует специального оборудования и является быстрым методом (результаты доступны через 15 мин). В зависимости от вида патогена тесты на основе латексной агглютинации показали хорошую чувстви-

тельность при обнаружении антигенов распространенных возбудителей ГБМ: 78–100% – для *H. influenzae* типа b, 67–100% – для *S. pneumoniae*, 69–100% – для *Streptococcus agalactiae* и 50–93% – для *N. meningitidis* [15].

Тем не менее диагностическая точность этого теста ограничена, так как отрицательный результат теста не позволяет гарантированно исключить инфекцию, вызванную специфическим менингеальным патогеном. Вопрос о рутинном использовании латекс-агглютинации для этиологической диагностики ГБМ до последнего времени оставался спорным. В публикациях хоть и редко, но приводятся ложноположительные результаты исследований, которые могут обусловить назначение некорректной терапии и продление срока госпитализации. Поэтому в Практических рекомендациях по ведению пациентов с бактериальным менингитом Американского общества инфекционных болезней, опубликованных в 2004 г., и затем в 2018 г. в обновленном Руководстве по использованию микробиологических методов для лабораторной диагностики инфекционных болезней, опубликованном Обществом инфекционных болезней США и Американским микробиологическим обществом, вообще не рекомендуют использовать данный метод в диагностике ГБМ [10, 15].

**Молекулярные методы.** Использование метода ПЦР позволяет сократить время получения результатов и обеспечивает дополнительное выявление случаев бактериального менингита, особенно у пациентов, которые получали лечение антибиотиками до взятия спинномозговой жидкости (СМЖ) на исследование [16].

Чувствительность метода ПЦР, как показано в некоторых исследованиях, составляла 79–100% при обнаружении *S. pneumoniae*, 91–100% – для *N. meningitidis* и 67–100% – для *H. influenzae* [17]. Специфичность метода составляла 95–100% для всех микроорганизмов. Вместе с тем некоторые проблемы, возникающие при ПЦР-анализах, пока не позволяют полностью заменить культуральный метод при диагностике ГБМ. Об этом указывается в «Руководстве ESCMID: диагностика и лечение острого бактериального менингита» и в Руководстве Общества инфекционных болезней США и Американского микробиологического общества [10, 13].

Проблемы при использовании ПЦР, которые упоминаются в вышеперечисленных руководствах, связаны с небольшим процентом отрицательных результатов, полученных в некоторых исследованиях, при одновременных положительных результатах посева СМЖ, с отсутствием возможности определения чувствительности выделенных штаммов и другими причинами [18].

Упомянув коммерческую панель для мультиплексной ПЦР, которая предназначена для обнаружения 14 вирусных, грибных и бактериальных патогенов, включая *E. coli* K1, *H. influenzae*, *L. monocytogenes*, *N. meningitidis*, *S. agalactiae* и *S. pneumoniae*, с целью диагностики менингита и энцефалита [19, 20] в Руководстве [10] ссылаются на небольшой клинический опыт ее использования и поэтому рассматривают данный тест как дополнительный. Затраты и проблемы интерпретации данных, связанные с технологией NGS (next-generation sequencing), в настоящее время не позволяют широко ее использовать в клинической практике [21].

Поэтому молекулярные тесты, которые уже используются как основной метод при диагностике энтеровирусных менингитов, в диагностике ГБМ рекомендуются пока в качестве дополнительного теста к микроскопическому и культуральному методам.

В нашей стране ПЦР успешно применяется для проведения эпидемиологического мониторинга за возбудителями ГБМ [22].

**Культуральный метод.** Бактериологическое исследование СМЖ с посевом на питательные среды является «золотым стандартом» в диагностике ГБМ. Выделенные культуры используются для определения чувствительности к антибиотикам, субтипирования, экспрессии антигенов, которые могут быть в дальнейшем применены при изготовлении новых вакцин и для других целей. Культуральный метод крайне важен, однако не всегда дает положительный результат, особенно на фоне антибактериальной терапии. Чувствительность культурального метода довольно высока и достигает 70–85% в том случае, если пациенты не получали антибиотикотерапию до начала исследования [15]. Отмечено, что чувствительность метода зависит от природы микроорганизма и составляет 96% для *H. influenzae*, 87% – *S. pneumoniae* и 82% – *N. meningitidis* [15].

Существенный рост в структуре ГБМ в последние годы удельного веса «прочих» возбудителей – *S. aureus* (12–23%) и *K. pneumoniae* (5–10,2%), а также некоторых редких возбудителей (4–6%), при которых данный метод является практически единственным, привел к увеличению диагностической роли культурального метода [8].

Успех выделения возбудителя зависит от ряда факторов, среди которых – соблюдение оптимальных условий сбора и транспортировки клинического материала в лабораторию (т.е. грамотное проведение преаналитического этапа), а также от выбора и качества питательных сред.

**Преаналитический этап и транспортные среды для основных возбудителей ГБМ.** Надлежащий сбор и транспортировка клинических образцов являются критичным моментом для выделения и идентификации возбудителей менингита. Оптимально клинический материал следует получать до начала антимикробной терапии, для того чтобы избежать потери жизнеспособности этиологических агентов.

Организационные и методологические принципы лабораторной диагностики менингококковой инфекции и ГБМ в РФ установлены методическими указаниями МУК 4.2.1887-04 [23]. В них описана тактика работы с основным биологическим материалом для исследования – СМЖ и кровью и приведены требования к доставке образцов или посевов в лабораторию: «незамедлительно в теплом виде или временное сохранение до доставки в условиях термостата при 37°C в течение не более чем 12 часов».

В последнее время бактериологические лаборатории все чаще получают образцы инфицированного материала на тампонах в транспортных средах из-за простоты использования, низкой стоимости и доступности. В литературе описаны результаты использования коммерческих транспортных систем для сбора и транспортировки клинического материала. Однако показано снижение количества жизнеспособных клеток *N. meningitidis* как минимум в два раза при хранении в транспортных средах по сравнению с прямым

посевом на питательные среды у постели больного [24]. В другом исследовании, посвященном изучению жизнеспособности прихотливых и неприхотливых микроорганизмов в четырех видах коммерческих транспортных систем при разных температурах в течение 48 ч, показано, что количество жизнеспособных клеток *S. pneumoniae* и *N. gonorrhoeae* значительно уменьшилось уже через 6 ч, даже со скоплениями тампонов [25]. Количество неприхотливых микроорганизмов, напротив, значительно выросло по сравнению с исходной концентрацией.

В Руководстве по лабораторной диагностике менингитов, разработанном экспертами Всемирной организации здравоохранения, для транспорта клинического материала рекомендована специальная транспортная среда – Trans-Isolate medium [6]. Использование этой транспортной среды позволяет увеличить время поддержания *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* в жизнеспособном состоянии до 3 мес. Trans-Isolate medium представляет собой двухфазную среду, где в качестве твердой фазы среды используется угольно-крахмальный агар, а бульонная среда содержит гидролизат соевого белка, гидролизат желатина и буферную систему (pH 7.2).

Еще одна транспортная среда, Dorset Egg Medium, упомянутая в данном руководстве, предназначена в основном для хранения изолятов – возбудителей ГБМ. На данной среде культуры *N. meningitidis* и *H. influenzae* могут храниться до 3 нед при 25°C, а *S. pneumoniae* – до 6 нед.

Высокая эффективность упомянутых транспортных сред диктует необходимость организации промышленного производства по выпуску транспортных систем на их основе.

**Питательные среды для выделения основных возбудителей ГБМ на аналитическом этапе исследования.**

Основные этиологические агенты ГБМ – *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *S. pneumoniae* отличаются высокой требовательностью к составу питательных сред. Методическими указаниями по лабораторной диагностике менингококковой инфекции и ГБМ для выделения *N. meningitidis* рекомендованы полужидкий сывороточный агар, сывороточный, кровяной и шоколадный агары [23]. При культивировании *S. pneumoniae* предпочтение отдается кровяному агару. Кроме того, *S. pneumoniae* культивируют на шоколадном, сывороточных агарах и на полужидком сывороточном агаре. Для роста *H. influenzae* необходимо наличие в питательной среде факторов роста – X (гемина или гематина) и V (никотинамидадениндинуклеотида – НАД), поэтому этот микроорганизм не растет на простых и сывороточных питательных средах. Кровяные агары не подходят для культивирования *H. influenzae* из-за содержащихся в нативной крови ферментов никотинамидадениндинуклеотидаз (НАДаз), инактивирующих фактор V. Основной средой для культивирования и выделения *H. influenzae* является шоколадный агар. Термическая обработка, которой подвергается кровь в процессе приготовления шоколадного агара, позволяет частично лизировать эритроциты, высвобождая тем самым факторы роста и разрушая НАДазы. Оптимальной средой, поддерживающей рост всех трех основных возбудителей ГБМ, является шоколадный агар [26].

В качестве основы шоколадного и кровяного агара методическими указаниями регламентировано использование



Рис. 1. Питательная среда для выделения и культивирования основных возбудителей гнойных бактериальных менингитов, готовая к применению (Шоколадный агар).

нескольких питательных сред: агара Хоттингера, колумбийского агара, агара для бруцелл, питательной среды для определения чувствительности микробов к антибиотикам (АГВ), эритроцит-агар. Руководством по лабораторным методам диагностики бактериальных менингитов, разработанным ВОЗ, для этих целей рекомендованы триптиказо-соевый агар (trypticase soy agar), сердечно-мозговой агар (brain heart infusion agar) и гонококковый агар (GC agar). Сывороточный агар готовят на бульоне из рыбного гидролизата, из бульона на переваре Хоттингера [23]. Подобное разнообразие основ может негативно влиять на воспроизводимость результатов исследований.

Известно, что биологические и физико-химические свойства шоколадного и кровяного агаров зависят от качества и типа используемой крови. Для приготовления данных сред используют дефибринированную баранью, лошадиную кровь и кровь крупного рогатого скота [27]. Человеческая кровь содержит антитела, которые могут ингибировать рост микроорганизмов, поэтому она пригодна только для приготовления шоколадного агара. Кровь, используемая для приготовления питательных сред, не должна содержать консерванты, что ограничивает срок ее годности и температурный режим хранения. Все перечисленные факторы создают проблемы при лабораторном изготовлении кровяных и шоколадных питательных сред. Дополнительные трудности возникают при приготовлении шоколадного агара, поскольку его качество и стандартность зависят не только от качества используемой крови, но и от навыков и умения лаборанта в процессе прогревания питательной среды.

С целью унификации и стандартизации качества питательных сред в ФБУН ГНЦ ПМБ для диагностики ГБМ разработаны и зарегистрированы в Росздравнадзоре или находятся на завершающих этапах регистрации несколько питательных сред. Проблему стандартности питательных сред решали путем замены биологических жидкостей (крови, сыворотки крови) на более стандартное сырье и ориентированности на организацию производства и выпуск коммерческих питательных сред, а проблему унификации – создани-

ем универсальной питательной среды для выделения всех возбудителей ГБМ.

Для культивирования и выделения менингококков разработана питательная среда Менингоагар в сухом виде, содержащая в своем составе стимулятор роста гемофильных микроорганизмов. В схеме лабораторной диагностики ГБМ она может быть использована самостоятельно как замена сывороточного агара либо при внесении 5% сыворотки крови животных как основа сывороточного агара.

Культивирование и выделение гемофильной палочки возможно осуществлять с использованием Гемофилус агара, который выпускается набором, содержащим питательную основу в готовом к применению виде, ростовую и селективную добавки в сухом виде. Гемофилус агар содержит факторы роста X и V, необходимые для роста бактерий рода *Haemophilus*, а использование селективной добавки позволяет выделять *H. influenzae* из контаминированного материала. Гемофилус агар обеспечивает рост штаммов *H. influenzae* через 18–24 ч инкубации при высеве единичных клеток.

В качестве универсальной питательной среды для выделения всех трех основных возбудителей ГБМ организован выпуск двух питательных сред – шоколадного агара и ГБМ-агара. Шоколадный агар выпускается в виде набора, состоящего из основы питательной среды, готовой к применению, ростовой добавки (РД-ША) и трех селективных добавок: СД-Г – для выделения гемофильной палочки, СД-П – для выделения пневмококка и СД-М – для выделения менингококка (рис. 1). Использование селективных добавок при исследовании ликвора и крови нецелесообразно, так как эти жидкости в норме стерильны и любой выделенный из них микроорганизм будет считаться возбудителем заболевания. При исследовании контаминированного посторонней микрофлорой материала, например мазков из зева, использование селективных добавок может значительно повысить выявляемость искомых микроорганизмов. Шоколадный агар удобен в применении, так как не требует дополнительной стерилизации. Для его приготовления достаточно расплавить содержимое флакона с основой питательной среды, растворить и добавить в основу содержимое флакона с РД-ША, а при необходимости и содержимое одного из флаконов с селективной добавкой, после чего разлить питательную среду в чашки Петри.

ГБМ-агар – сухая питательная среда, которая, как и шоколадный агар, предназначена для выделения основных возбудителей бактериальных менингитов. ГБМ-агар представляет собой набор реагентов, состоящий из основы питательной среды и ростовой добавки. В связи с тем что этот набор выпускается в сухом виде, срок его годности составляет два года, что в два раза превышает срок годности шоколадного агара. Шоколадный агар и ГБМ-агар обеспечивают рост *H. influenzae*, *N. meningitidis* и *S. pneumoniae* через 18–24 ч инкубации при высеве единичных клеток. Обе питательные среды обладают дифференцирующими свойствами в отношении пневмококка: на шоколадном агаре в зоне роста *S. pneumoniae* цвет среды изменяется с коричневого на зеленовато-желтый, а на ГБМ-агаре происходит обесцвечивание среды (рис. 2). В схеме лабораторной диагностики бактериальных менингитов каждая из этих двух сред может быть использована в качестве замены шоколадного агара

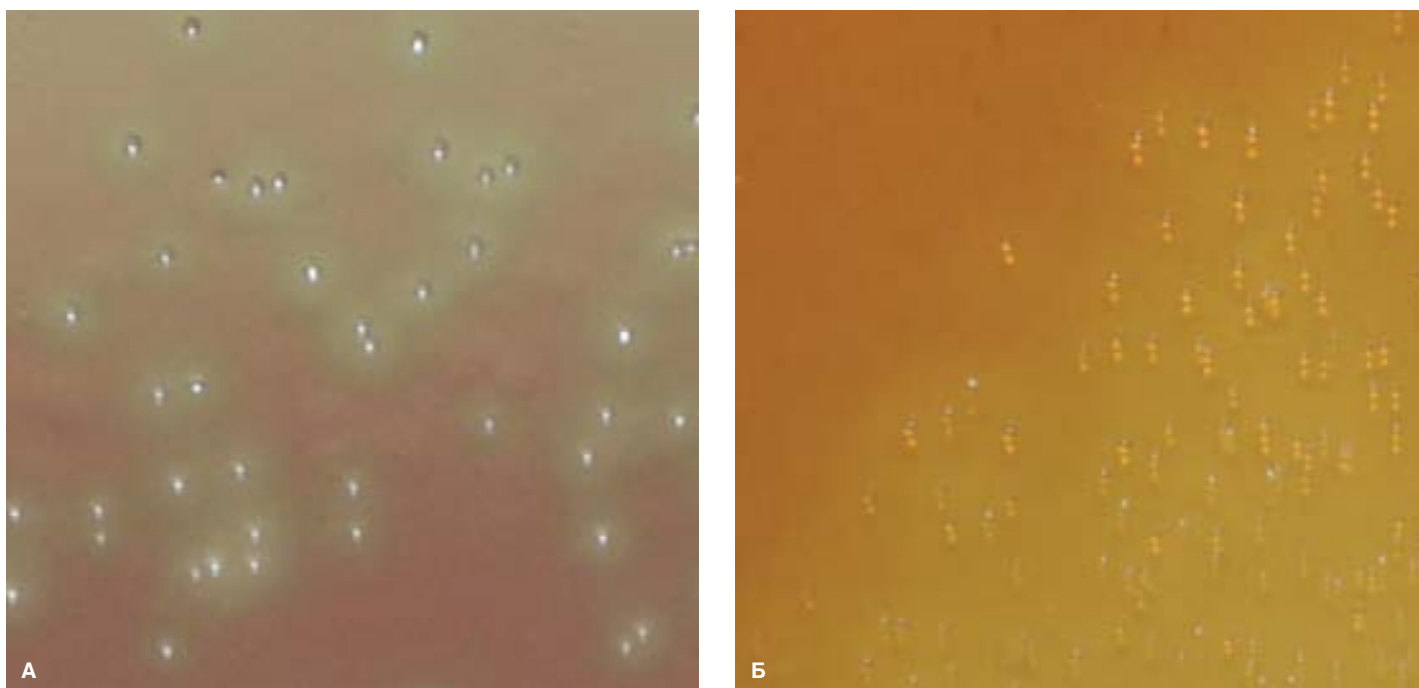


Рис. 2. Рост *S. pneumoniae* при культивировании на Шоколадном агаре (А) и на ГБМ-агаре (Б).

с нагретой кровью. Шоколадный агар и ГБМ-агар обеспечивают рост и других возбудителей ГБМ, что положительно отличает культуральный метод от других методов в диагностике ГБМ.

Проведены сравнительные испытания питательных сред ФБУН ГНЦ ПМБ, сред аналогичного назначения иностранного производства и сред лабораторного приготовления с использованием музейных штаммов и клинических образцов (СМЖ от больных с подозрением на ГБМ и мазков из зева от пациентов с заболеваниями верхних дыхательных путей). Обобщенные результаты в 4-балльной плюсовой системе представлены в таблице.

Показано, что питательные среды ФБУН ГНЦ ПМБ по ростовым свойствам не только не уступают средам сравнения, но и превосходят по чувствительности и скорости роста шоколадные агары лабораторного приготовления [28, 29].

**Питательные среды для определения антибиотико-чувствительности возбудителей ГБМ.** Одной из основных задач, ежедневно решаемой бактериологами в клинических лабораториях, является определение чувствительности патогенов к антимикробным препаратам. Целесообразность ее проведения диктуется необходимостью правильного выбора антибиотиков для лечения больных, а также важностью мониторинга антибиотикорезистентности циркулирующих штаммов. Достоверность результатов зависит от многих факторов, основным среди которых является качество питательных сред.

В настоящее время существует два международных стандарта по оценке чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, разработанных Международным институтом по клиническим лабораторным стандартам (CLSI) и Европейским комитетом по тестированию чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST). Основные различия стандартов касаются критериев оценки чувствительности и питательных сред, используемых для опре-

деления чувствительности микроорганизмов со сложными питательными потребностями, к числу которых относятся основные возбудители ГБМ.

В нашей стране в настоящее время также действуют два национальных стандарта: методические указания «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» (МУК 4.2.1890-04), основанные на руководящих принципах CLSI, и Клинические рекомендации по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, основанные на методологии EUCAST.

Руководящими принципами CLSI рекомендуются две питательные среды для тестирования диско-диффузионным методом и методом градиентной диффузии чувствительности основных возбудителей ГБМ: Haemophilus test medium – для *H. influenzae*, и агар Мюллера-Хинтона с добавлением 5%

Таблица. Сравнительная оценка питательных сред для выделения возбудителей ГБМ

Питательная среда	Характер роста возбудителей ГБМ		
	<i>N. meningitidis</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>S. pneumoniae</i>
Менингоагар (Оболенск)	++++*	Нет роста	++
Гемофилус агар (Оболенск)	+++	++++	++
Шоколадный агар (Оболенск)	++++	++++	++++
ГБМ-агар (Оболенск)	++++	++++	++++
Шоколадный агар* (BD)	+++	++++	++++
Шоколадный агар* (BioMerieux)	++++	++++	++++
Шоколадный агар с бараньей кровью лабораторного изготовления	+++	++++	+++

\*интенсивность роста микроорганизмов в 4-балльной плюсовой системе;  
 \*\*шоколадный агар на основе гонококкового агара (GC Medium Base, Becton Dickinson, кат. №211275) с добавлением гемоглобина (Hemoglobin Bovine Freeze-Dried, BD, кат. №212392) и смеси факторов роста (IsoVitalex Enrichment, BD, кат. № 211875);  
 \*\*\*шоколадный агар, готовый к применению, во флаконах (CHOCO-F, bioMerieux, кат. № 41536) с добавлением смеси факторов роста (PolyViteX, bioMerieux, кат. № 55651).

дефибрированной бараньей крови – для остальных микроорганизмов со сложными питательными потребностями.

Согласно требованиям EUCAST, для определения чувствительности *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* следует пользоваться универсальной питательной средой – агаром Мюллера-Хинтон с добавлением 5% дефибрированной лошадиной крови и 20 мг/л β-НАД.

Выбор методологии определения чувствительности определяется задачами исследования, но предпочтение отдается европейскому стандарту и его российскому аналогу – Клиническим рекомендациям, поскольку базы данных ежегодно обновляются и находятся в свободном доступе.

Выбор метода оценки чувствительности зависит от природы возбудителя. Из-за отсутствия критериев интерпретации результатов для диско-диффузионного метода антибиотикочувствительность *N. meningitidis* рекомендуется определять одним из методов определения минимально подавляющих концентраций. Как правило, это метод градиентной диффузии (метод E-тестов) [30].

Определение чувствительности *H. influenzae* и *S. pneumoniae* к антимикробным препаратам чаще всего проводят диско-диффузионным методом.

В ФБУН ГНПМБ разработана технология производства и налажен промышленный выпуск агара Мюллера-Хинтон в сухом виде (Регистрационное удостоверение № РЗН 2017/5962 от 10.07.2017), который удовлетворяет требованиям всех современных нормативных документов, включая новый международный отраслевой стандарт и технические условия ISO/TS 16782:2016 «Clinical laboratory testing – Criteria for acceptable lots of dehydrated Mueller-Hinton agar and broth for antimicrobial susceptibility testing». В данном стандарте введены новые показатели качества агара Мюллера-Хинтон, такие как концентрация цинка (не выше 3 мг/л) и марганца (не выше 8 мг/л), и пересмотрены требования к уже известным показателям: содержанию кальция, магния и тимидина. Соответствие агара Мюллера-Хинтон новым требованиям позволяет гарантировать стандартизацию процедуры тестирования чувствительности к карбапенемам, тигециклину, аминогликозидам, фторхинолонам и другим антибиотикам и повысить надежность получаемых результатов.

Дополнительной гарантией достоверности получаемых результатов исследований является проведение внутрилабораторного контроля качества (ВКК) расходных материалов, включая питательные среды надежных производителей. ВКК расходных материалов (питательных сред, дисков, тест-систем и др.) – обязательный элемент системы обеспечения качества лабораторных исследований. Его цель – выявить, оценить и исправить ошибки до того, как будет выдан отчет с результатами анализов. Необходимость проведения определена положениями ГОСТ Р ИСО 15189 «Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности» и ГОСТ ИСО 17025 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий».

Руководством ВОЗ по лабораторной диагностике менингитов регламентировано обязательное проведение контроля качества всех питательных сред для выделения *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* с использованием подходящих, хорошо охарактеризованных эталонных штаммов *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae* [6].

Показатели качества и методы контроля качества питательных сред изложены в национальных нормативных документах: МУК 4.2.2316-08, ГОСТ Р ЕН 12322-2010, Клинические рекомендации (2014) по проведению ВКК питательных сред для клинических микробиологических исследований.

## Заключение

При диагностике ГБМ культуральный метод с посевом клинического материала на питательные среды остается одним из основных, несмотря на то, что не всегда дает положительный результат. Современные молекулярные методы международными стандартами классифицируются пока как дополнительные методы, используемые при отрицательных результатах культурального или микроскопического методов. В данной ситуации представляется важной стандартизация процедуры исследования как на преаналитическом, так и на аналитическом этапе исследований за счет использования стандартных высококачественных питательных сред, поскольку стандартность и стабильно высокое качество питательных сред – важное условие получения достоверных результатов исследований при диагностике бактериальных менингитов.

## Литература

1. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2017 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2018, 268 с.
2. Королева ИС, Белошицкий ГВ, Королева МА, Закроева ИМ, Спирихина ЛВ, Миронов КО, Шипулин ГА. Менингококковая инфекция и гнойные бактериальные менингиты в Российской Федерации: десятилетнее эпидемиологическое наблюдение. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2013;2:15-20.
3. Thigpen VC, Whitney CG, Meisssonier NE, et al. Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007. *New England Journal of Medicine*. 2011;36(21):2016-25.
4. Пилипенко ВВ. Бактериальные гнойные менингиты – исторический экскурс. Вестник российской военно-медицинской академии. 2011;1(33):266-72.
5. Oordt-Speets AM, Bolijn R, van Hoorn RC, Bhavsar A, Kyaw MH. Global etiology of bacterial meningitis: A systematic review and metaanalysis. *PLoS One*. 2018 Jun 11;13(6):e0198772. DOI: 10.1371/journal.pone.0198772
6. Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. WHO Manual, second Edition, 2011, 312 p. WHO/IVB.11.09. Available at: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70765/WHO\\_IVB\\_11.09\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70765/WHO_IVB_11.09_eng.pdf);
7. Балмасова ИП, Венгеров ЮЯ, Раздобарина СЕ, Нагибина МВ. Иммуногенетические особенности бактериальных гнойных менингитов. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2014;19(5):4-9.
8. Шишов АС, Григорьевская УБ, Гурьянов АВ, Данилова ЛВ, Саврасова НМ, Соловьева ЛЯ, и др. Некоторые клинические особенности бактериальных инфекций с синдромом гнойного менингита. Журнал неврологии и психиатрии. 2011;111(4):90-5.
9. Королева ИС, Белошицкий ГВ, Закроева ИМ, Королева МА. Результаты эпидемиологического мониторинга бактериальных менингитов на территории Российской Федерации. Медицинский алфавит. 2013;1(5):8-10.
10. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the

- American Society for Microbiology. Clin Infect Dis. 2018 Aug 31;67(6):e1-e94. DOI: 10.1093/cid/ciy381.
11. Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D. Epidemiology, Diagnosis, and Antimicrobial Treatment of Acute Bacterial Meningitis. Clin Microbiol Rev. 2010 Jul; 23(3):467-92. DOI: 10.1128/CMR.00070-09.
  12. Meningococcal vaccines: WHO position paper. Weekly epidemiological record WHO. 2011;86(47):521-40.
  13. van de Beek D, Cabellos C, Dzupova O, Esposito S, Klein M, Kloek AT, et al. ESCMID Study Group for Infections of the Brain (ESGIB). ESCMID guideline: diagnosis and treatment of acute bacterial meningitis. Clin Microbiol Infect. 2016 May;22 Suppl 3:S37-62. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.01.007
  14. Greenlee JE. Approach to diagnosis of meningitis. Cerebrospinal fluid evaluation. Infect Dis Clin North Am. 1990 Dec;4(4):583-98.
  15. Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, Whitley RJ. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. Clin Infect Dis. 2004 Nov 1;39(9):1267-84. DOI: 10.1086/425368
  16. Baspınar EO, Dayan S, Bekçibaşı M, Tekin R, Ayaz C, Devenci Ö, Hoşoğlu S. Comparison of culture and PCR methods in the diagnosis of bacterial meningitis. Braz J Microbiol. 2017 Apr - Jun;48(2):232-236. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.06.014
  17. Brouwer MC, Thwaites GE, Tunkel AR, van de Beek D. Dilemmas in the diagnosis of acute community-acquired bacterial meningitis. Lancet. 2012 Nov 10; 380(9854):1684-92. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61185-4.
  18. Munoz-Almagro C, Rodriguez-Plata MT, Marin S, Esteva C, Esteban E, Gene A, Gelabert G, Jordan I. Polymerase chain reaction for diagnosis and serogrouping of meningococcal disease in children. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009 Feb;63(2): 148-54. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.10.008
  19. Leber AL, Everhart K, Balada-Llasat JM, Cullison J, Daly J, Holt S, et al. Multicenter evaluation of Biofire Filmarray meningitis/encephalitis panel for detection of bacteria, viruses, and yeast in cerebrospinal fluid specimens. J Clin Microbiol. 2016 Sep;54(9):2251-61. DOI: 10.1128/JCM.00730-16
  20. Hanson KE. The First fully automated molecular diagnostic panel for meningitis and encephalitis: how well does it perform, and when should it be used? J Clin Microbiol. 2016 Sep;54(9):2222-4. DOI: 10.1128/JCM.01255-16
  21. Wilson MR, Naccache SN, Samayoa E, Biagtan M, Bashir H, Yu G, et al. Actionable diagnosis of neuroleptospirosis by next-generation sequencing. N Engl J Med. 2014 Jun 19;370(25):2408-17. DOI: 10.1056/NEJMoa1401268.
  22. Матосова СВ, Миронов КО, Платонов АЕ, Шипулина ОЮ, Шипулин ГА, Нагибина МВ, Венгеров ЮА. Молекулярно-биологический мониторинг возбудителей гнойного бактериального менингита на современном этапе. Инфекционные болезни. Новости. Лечение. Обучение. 2018;1:93-9.
  23. Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов. Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2005, 48 с.
  24. Cunningham R, Matthews R, Lewendon G, Harrison S, Stuart JM. Improved Rate of Isolation of *Neisseria meningitidis* by Direct Plating of Pharyngeal Swabs. J Clin Microbiol. 2001 Dec;39(12):4575-6.
  25. DeBurger B, Mortensen J. What's New in the World of Swabs? Journal of Continuing Education Topics and Issues. 2008;Article 332:18-22.
  26. Использование питательных сред для диагностики гнойных бактериальных менингитов: Методические рекомендации. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2014, 11 с.
  27. Поляк МС, Сухаревич ВИ, Сухаревич МЭ. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии. СПб.: ЭЛБИ-СПб; 2008, 350 с.
  28. Подкопаев ЯВ, Домотенко ЛВ, Морозова ТП, Храмов МВ, Шепелин АП. Отечественные питательные среды для диагностики гнойных бактериальных менингитов. Клиническая лабораторная диагностика. 2015;60(5):59-64.
  29. Подкопаев ЯВ, Домотенко ЛВ, Круглов АН, Рябенко ИВ, Детушев КВ, Морозова ТП, Шепелин АП. Сравнительная оценка питательных сред для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов. Инфекция и иммунитет. 2016;6(4):389-94.
  30. Краева ЛА. Микробиологическая диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов. Инфекция и иммунитет. 2011;1(1):51-8.

## References

1. On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2017: State report. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; 2018, 268 p. (In Russian).
2. Koroleva IS, Beloshitsky GV, Koroleva MA, Zakroyeva IM, Spirikhina LV, Mironov KO, Shipulin GA. Meningococcal infection and purulent bacterial meningitides in the Russian Federation: 10-year epidemiological observation. Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items. 2013;2:15-20. (In Russian).
3. Thigpen VC, Whitney CG, Meisssonier NE, et al. Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007. New England Journal of Medicine. 2011;36(21):2016-25.
4. Piliipenko VV. Bacterial purulent meningitis – the historical overview. Vestnik of Russian Military Medical Academy. 2011;1(33):266-72. (In Russian).
5. Oordt-Speets AM, Bolijn R, van Hoorn RC, Bhavsar A, Kyaw MH. Global etiology of bacterial meningitis: A systematic review and metaanalysis. PLoS One. 2018 Jun 11;13(6):e0198772. DOI: 10.1371/journal.pone.0198772
6. Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. WHO Manual, second Edition, 2011, 312 p. WHO/IVB.11.09. Available at: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70765/WHO\\_IVB\\_11.09\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70765/WHO_IVB_11.09_eng.pdf);
7. Balmasova IP, Vengerov YuYa, Razdobarina SE, Nagibina MV. Immunopathogenetic features of bacterial purulent meningitides. Epidemiology and Infectious Diseases. 2014;19(5):4-9. (In Russian).
8. Shishov AS, Grigorevskaia UB, Gur'ianov AV, Danilova LV, Savrasova NM, Solov'eva Lla, et al. Immunopathogenetic features of bacterial purulent meningitides. Neuroscience and Behavioral Physiology. 2011;111(4):90-5. (In Russian).
9. Koroleva IS, Beloshitskii GV, Zakroeva IM, Koroleva MA. Rezul'taty epidemiologicheskogo monitoringa bakterial'nykh meningitov na territorii Rossiiskoi Federatsii. Medical Alphabet. 2013;1(5):8-10. (In Russian).
10. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. Clin Infect Dis. 2018 Aug 31;67(6):e1-e94. DOI: 10.1093/cid/ciy381.
11. Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D. Epidemiology, Diagnosis, and Antimicrobial Treatment of Acute Bacterial Meningitis. Clin Microbiol Rev. 2010 Jul; 23(3):467-92. DOI: 10.1128/CMR.00070-09.
12. Meningococcal vaccines: WHO position paper. Weekly epidemiological record WHO. 2011;86(47):521-40.
13. van de Beek D, Cabellos C, Dzupova O, Esposito S, Klein M, Kloek AT, et al. ESCMID Study Group for Infections of the Brain (ESGIB). ESCMID guideline: diagnosis and treatment of acute bacterial meningitis. Clin Microbiol Infect. 2016 May;22 Suppl 3:S37-62. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.01.007
14. Greenlee JE. Approach to diagnosis of meningitis. Cerebrospinal fluid evaluation. Infect Dis Clin North Am. 1990 Dec;4(4):583-98.
15. Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, Whitley RJ. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. Clin Infect Dis. 2004 Nov 1;39(9):1267-84. DOI: 10.1086/425368
16. Baspınar EO, Dayan S, Bekçibaşı M, Tekin R, Ayaz C, Devenci Ö, Hoşoğlu S. Comparison of culture and PCR methods in the diagnosis of bacterial meningitis. Braz J Microbiol. 2017 Apr - Jun;48(2):232-236. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.06.014



17. Brouwer MC, Thwaites GE, Tunkel AR, van de Beek D. Dilemmas in the diagnosis of acute community-acquired bacterial meningitis. *Lancet*. 2012 Nov 10; 380(9854):1684-92. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61185-4.
18. Munoz-Almagro C, Rodriguez-Plata MT, Marin S, Esteve C, Esteban E, Gene A, Gelabert G, Jordan I. Polymerase chain reaction for diagnosis and serogrouping of meningococcal disease in children. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009 Feb;63(2): 148-54. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.10.008
19. Leber AL, Everhart K, Balada-Llasat JM, Cullison J, Daly J, Holt S, et al. Multicenter evaluation of Biofire Filmarray meningitis/encephalitis panel for detection of bacteria, viruses, and yeast in cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol*. 2016 Sep;54(9):2251-61. DOI: 10.1128/JCM.00730-16
20. Hanson KE. The First fully automated molecular diagnostic panel for meningitis and encephalitis: how well does it perform, and when should it be used? *J Clin Microbiol*. 2016 Sep;54(9):2222-4. DOI: 10.1128/JCM.01255-16
21. Wilson MR, Naccache SN, Samayoa E, Biagtan M, Bashir H, Yu G, et al. Actionable diagnosis of neuroleptospirosis by next-generation sequencing. *N Engl J Med*. 2014 Jun 19;370(25):2408-17. DOI: 10.1056/NEJMoa1401268.
22. Matosova SV, Mironov KO, Platonov AE, Shipulina OYu, Shipulin GA, Nagibina MV, Vengerov YuYa. Molecular biological monitoring of purulent bacterial meningitis pathogens at the present stage. *Infectious diseases: News, Opinions, Training*. 2018;1:93-9. (In Russian).
23. Laboratory diagnosis of meningococcal infection and purulent bacterial meningitis. Methodical instructions. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; 2005, 48 p. (In Russian).
24. Cunningham R, Matthews R, Lewendon G, Harrison S, Stuart JM. Improved Rate of Isolation of *Neisseria meningitidis* by Direct Plating of Pharyngeal Swabs. *J Clin Microbiol*. 2001 Dec;39(12):4575-6.
25. DeBurger B, Mortensen J. What's New in the World of Swabs? *Journal of Continuing Education Topics and Issues*. 2008;Article 332:18-22.
26. The use of culture media for the diagnosis of purulent bacterial meningitis. Guidelines. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; 2014, 11 p. (In Russian).
27. Polyak MS, Sukharevich VI, Sukharevich ME. Pitatel'nye sredy dlya meditsinskoi i sanitarnoi mikrobiologii. St. Petersburg: "ELBI-SPb" Publ.; 2008, 350 p. (In Russian).
28. Podkopaev YaV, Domotenko LV, Morozova TP, Khramov MV, Shepelin AP. The national nutrient medium for diagnostic of purulent bacterial meningitis. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2015;60(5):59-64. (In Russian).
29. Podkopaev YaV, Domotenko LV, Kruglov AN, Ryabchenko IV, Detushev KV, Morozova TP, Shepelin AP. Comparative evaluation of culture media for pathogen isolation of purulent bacterial meningitis. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2016;6(4):389-94. (In Russian).
30. Kraeva LA. Microbiological diagnostics of the meningococcal infection and purulent bacterial meningitis. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2011; 1(1):51-8. (In Russian).

**Информация об авторах:**

Подкопаев Ярослав Васильевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред 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

Морозова Татьяна Павловна, научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред 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

Косилова Ирина Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред 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

Шепелин Анатолий Прокопьевич, доктор биологических наук, заместитель директора по научно-производственной деятельности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0020

**Information about authors:**

Yaroslav V. Podkopaev, PhD (Biology), researcher of the laboratory of culture media development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Tatiana P. Morozova, researcher of the laboratory of culture media development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Irina S. Kosilova, junior researcher of the laboratory of culture media development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Anatoly P. Shepelin, Sc.D. (Bio.), Deputy Director for science and production, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0020

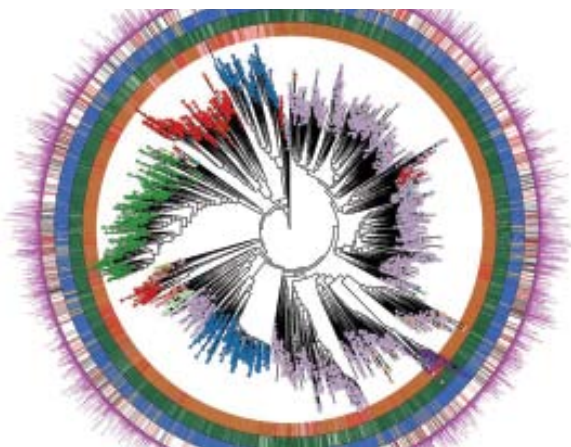
**НОВОСТИ НАУКИ**

**Самый большой каталог бактерий в организме человека содержит более 150 тысяч геномов**

Был собран самый большой в истории каталог бактериальных и архейных микробов, обычно населяющих человеческое тело в разных популяциях мира. Это основной результат нового исследования, координируемого Николой Сегатой и Эдоардо Пасолли из Лаборатории вычислительной метагеномики в Университете Тренто, Италия. Работа появилась в сети в научном журнале «Cell».

*The largest ever catalog of bacteria in the human body contain over 150 thousands genomes [Electronic resource].*

*URL: <https://phys.org/news/2019-03-largest-bacteria-human-body-thousands.html>*



# Питательные среды для выделения дрожжевых и плесневых грибов. Санитарно-микологический анализ пищевых продуктов

А.П.Шепелин, О.В.Полосенко, И.И.Марчихина, Л.П.Шолохова

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

Доктрина продовольственной безопасности РФ определяет основные направления деятельности по продовольственной безопасности в области обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов и качества питания населения Российской Федерации.

Технический регламент Таможенного союза содержит обязательные требования по разработке, внедрению и поддержанию на предприятии-производителе пищевой продукции процедур, основанных на принципах HACCP. Одним из основных микробиологических факторов риска, по которым необходим учет, являются микроорганизмы порчи: дрожжи и плесневые грибы. Семейство плесневых грибов и дрожжей довольно активно внедряется в среду обитания человека. Метод определения дрожжей и плесеней основан на высеве определенного количества продукта в жидкую среду для обогащения, последующем пересеве на поверхность агаризованных селективных сред с ингибиторами для выделения и дифференциации дрожжей и плесневых грибов по характеру роста. В ходе работы оценивалась эффективность диагностических свойств комплекса питательных сред ФБУН ГНЦ ПМБ, предназначенных для культивирования и выделения дрожжевых и плесневых грибов.

*Ключевые слова:* дрожжи, плесневые грибы, микробиологический анализ пищевых продуктов

**Для цитирования:** Шепелин А.П., Полосенко О.В., Марчихина И.И., Шолохова Л.П. Питательные среды для выделения дрожжевых и плесневых грибов. Санитарно-микологический анализ пищевых продуктов. Бактериология. 2018; 3(4): 41–46. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-41-46

## Nutritional media for isolation of yeast and molding mushrooms. Sanitary and mycological analysis of food products

A.P.Shepelin, O.V.Polosenko, I.I.Marchikhina, L.P.Sholokhova

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

The Doctrine of Food Security of the Russian Federation determines the main areas of food safety activities in the field of ensuring the quality and safety of food products and the quality of nutrition of the population of the Russian Federation.

The technical regulations of the customs union contain mandatory requirements for the development, implementation and maintenance of procedures at the manufacturer of food products based on the principles of HACCP. One of the main microbiological risk factors for which accounting is required are spoilage microorganisms: yeast and mold fungi. The family of mold fungi and yeast is quite actively introduced into the human habitat. The method for determining yeasts and molds is based on sowing a certain amount of product into a liquid nutrient medium for enrichment, followed by subculture on the surface of agar selective media with inhibitors to isolate and differentiate yeast and mold fungi according to their growth pattern. The effectiveness of the diagnostic properties of the complex of nutrient media of the SRCAMB designed for the cultivation and isolation of yeast and mold fungi was evaluated in the course of the work.

*Keywords:* yeast, mold fungi, microbiological analysis of food

**For citation:** Shepelin A.P., Polosenko O.V., Marchikhina I.I., Sholokhova L.P. Nutritional media for isolation of yeast and molding mushrooms. Sanitary and mycological analysis of food products. Bacteriology. 2018; 3(4): 41–46. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-41-46

### Для корреспонденции:

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

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

Телефон: (4967) 36-0020

E-mail: shepelin@obolensk.org

Статья поступила 17.10.2018 г., принята к печати 25.12.2018 г.

### For correspondence:

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

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

Phone: (4967) 36-0020

E-mail: shepelin@obolensk.org

The article was received 17.10.2018, accepted for publication 25.12.2018

Условием выпуска безопасной для здоровья потребителей пищевой продукции в России является повышение санитарной культуры производства и организация системы контроля качества сырья и продукции на предприятиях пищевой промышленности – ХАССП.

Система ХАССП обеспечивает контроль на всех этапах изготовления пищевых продуктов, в любой точке процесса их производства, хранения и реализации продукции, где могут возникнуть опасные ситуации [1].

На пищевых предприятиях одним из основных микробиологических факторов риска, по которым необходим учет, являются микроорганизмы порчи – дрожжи и плесневые грибы [2, 3].

В Российской Федерации и странах Таможенного Союза требования к контролю микроорганизмов порчи в продуктах содержатся в ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции», Технических регламентах ТР ТС 023/2011 «На соковую продукцию», ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции» и др. [4–6].

Семейство плесневых грибов и дрожжей довольно активно внедряется в среду обитания человека. Они присутствуют в верхних слоях почвы, структурируя и формируя ее биохимический состав; в ягодах, фруктах и овощах, ускоряя процесс их гниения; на стенах, полах и потолках затемненных помещений с повышенной влажностью. Споры плесени очень негативно воздействуют на слизистые оболочки организма, вызывая иммунные реакции [7].

Некоторые представители грибов рода *Aspergillus* (главным образом *A. flavus* и *A. parasiticus*) способны продуцировать афлатоксины. Из всех известных биологических ядов, обнаруженных на сегодняшний день, афлатоксины являются самыми сильными гепатоканцерогенами [8].

К факторам патогенности у грибов рода *Candida* относятся: секреция протеолитических ферментов и гемолизина, дерматонекротическая активность и адгезивность (способность прикрепляться к клеткам эпителия). Ими могут быть и фосфолипазы, блокирующие развитие реакции местного иммунитета. По наличию факторов патогенности *C. albicans* превосходит все прочие виды *Candida* [9].

Характер и проявления микробиологической порчи продуктов зависят как от спектра микроорганизмов, присутствующих в конкретном продукте, так и от характеристик самого продукта, влияющих на состав и конкурентное взаимодействие представителей аутохтонной и транзитной микрофлоры. В свежих продуктах с хорошими условиями для роста (рН, близкий к нейтральному, высокое содержание влаги и питательных веществ) бактерии выигрывают конкурентную борьбу у медленно растущих дрожжей и плесеней. Поэтому свежее мясо, птица, рыба и молочные продукты редко содержат в значимых количествах дрожжи или плесени, которые попадают в них из окружающей среды. Однако в более экстремальных условиях (низкие значения рН, низкое содержание воды, присутствие консервантов), которые создаются в процессе обработки продуктов для ограничения микробного роста и увеличения сроков хранения, грибы начинают преобладать. Плесени, как правило, аэробны, и для их развития требуется присутствие кислорода, тогда как дрожжи способны развиваться как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

Однако вне зависимости от физиологии все грибы отличаются более высокой по сравнению с большинством бактерий устойчивостью к низким значениям рН, высокой осмотической активности среды, микробицидным агентам и способны использовать более труднодоступные источники углерода [3, 10].

Микологические исследования продуктов питания культуральными методами проводят в клинико-диагностических лабораториях и при санитарно-гигиенических исследованиях для анализа микробиологического риска с целью обеспечения качества и безопасности их для потребителей. Важно применение оптимального набора питательных сред, позволяющего определить принадлежность к грибам на основании морфологических и культуральных признаков – формы клеток, характерных колоний, наличия псевдомицелия.

Метод определения дрожжей и плесеней основан на высеве определенного количества продукта в жидкую среду для обогащения, инкубировании посевов, последующем пересеве культуральной жидкости на поверхность агаризованной селективной среды с ингибиторами для выделения и дифференциации дрожжей и плесневых грибов по характеру роста.

Подсчет колоний дрожжей и плесеней обычно проводят либо методом разлива сред, который позволяет облегчить задачу, либо методом подсчета при поверхностном посеве, который обеспечивает максимальное воздействие на клетки со стороны атмосферного кислорода и позволяет избежать теплового воздействия от расплавленного агара [11].

Из пробы пищевого продукта, в котором нормируется количество дрожжей и (или) плесневых грибов, или из исходного разведения пищевого продукта готовят ряд разведений в соответствии с допустимым количеством дрожжей и (или) плесневых грибов, указанным в нормативно-технической документации на конкретный вид пищевого продукта. В отечественной нормативно-методической базе существует ряд методических документов, регламентирующих определение микроорганизмов порчи в продуктах питания [12–17]. Главное отличие методик, изложенных в отечественных и международных документах, заключается в ассортименте питательных сред, которые регламентированы для определения соответствующих показателей. Кроме того, есть определенные различия в способах посева, а также температуре и времени инкубации [8].

Для количественного определения плесеней обычно используют несколько питательных сред, поскольку универсальной среды до сих пор не существует. Рекомендуется использовать агар Чапека, декстрозный агар Сабуро, глюкозный агар на основе дрожжевого экстракта, агар на солодовом экстракте, питательную среду общего назначения – агар для определения микробного числа с добавлением хлорамфеникола и хлортетрациклина. Для ускоренной идентификации грибов используются хромогенные среды.

Поскольку в большинстве пищевых продуктов может развиваться несколько видов плесеней, для микологического анализа таких продуктов может потребоваться несколько сред и разные условия инкубирования, особенно если требуется определить не только их количество. Еще одним лимитирующим фактором является отсутствие единых правил

по выбору антибиотика для подавления размножения сопутствующих бактерий [18].

**Цель исследования** – изучение диагностической ценности питательных сред Сабуро, предназначенных для накопления, выращивания, подсчета общего числа дрожжевых и плесневых грибов в продуктах питания.

### Материалы и методы

Для обнаружения отдельных грибов и дрожжей разработан ряд специальных культуральных сред, обладающих различной эффективностью. Питательные среды производства ФБУН ГНЦ ПМБ широко используются при проведении бактериологических исследований в санитарной и клинической микробиологии: бульоны Сабуро, питательная среда №2 ГРМ, Сабуро-мальтоза-агар, агар Сабуро с хлорамфениколом и т.д. Белковой основой сред являются панкреатические гидролизаты рыбной муки и казеина, обеспечивающие питательные потребности широкого круга микроорганизмов, в том числе дрожжевых и плесневых грибов. В качестве стабилизатора рН (5,7–6,3) в состав сред Сабуро входят однозамещенный фосфат натрия или лимонная кислота. Высокая концентрация углеводов (глюкозы, мальтозы) и низкий уровень рН делают эту среду селективной для грибов. Ингибиторы: 2% раствор теллурида калия, левомецетина натрия сукцинат (хлорамфеникол) подавляют рост большинства сопутствующих бактерий при выделении патогенных грибов при анализе образцов.

В ходе работы оценивалась эффективность диагностических свойств комплекса питательных сред ФБУН ГНЦ ПМБ,

предназначенных для культивирования и выделения дрожжевых и плесневых грибов.

Качество питательных сред оценивалось по ростовым свойствам на наборе тест-штаммов патогенных для человека грибов родов *Candida* и *Aspergillus*.

### Результаты и обсуждение

При исследовании пищевых продуктов навеску продукта, в массе (объеме) которой предусматривается отсутствие дрожжей и плесневых грибов, отбирали весовым или объемным методом, вносили в жидкую среду Сабуро и тщательно перемешивали [17].

В качестве среды накопления использовали питательную среду для культивирования и выявления дрожжевых и плесневых грибов сухую (бульон Сабуро), предназначенную для выявления дрожжевых и плесневых грибов в продуктах питания, фармацевтических, парфюмерно-косметических и других объектах при санитарно-бактериологических исследованиях, а также для культивирования чистых культур.

**Специфическая активность.** При посеве в 10 мл среды по 0,1 мл микробных взвесей тест-штаммов *Candida albicans* NCTC 885-653 с концентрацией  $10^3$  КОЕ/мл и *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 с концентрацией  $0,5 \times 10^3$  КОЕ/мл в бульон Сабуро сухой (производства ФБУН ГНЦ ПМБ) во всех засеянных пробирках через 5 сут инкубации при температуре  $(22,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$  визуально обнаруживался рост:

- *Candida albicans* NCTC 885-653 – в виде белого осадка на дне пробирки (рис. 1);

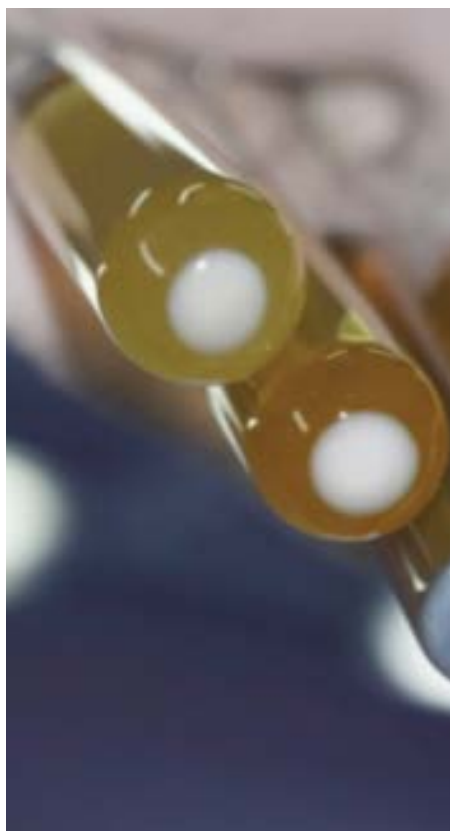


Рис. 1. Рост тест-штамма *C. albicans* NCTC 885-653 в бульоне Сабуро.



Рис. 2. Рост тест-штамма *A. brasiliensis* ATCC 16404 в бульоне Сабуро.



Рис. 3. Рост тест-штамма *C. albicans* NCTC 885-653 в бульоне Сабуро с теллуридом калия.



Рис. 4. Рост тест-штамма *C. albicans* NCTC 885-653 на агаре Сабуро.



Рис. 5. Рост тест-штамма *A. brasiliensis* ATCC 16404 на агаре Сабуро.



Рис. 6. Рост тест-штамма *C. albicans* NCTC 885-653 на агаре Сабуро с хлорамфениколом.

• *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 – в виде многоядерного мицелия в среде и на поверхности среды (рис. 2).

При внесении 2% раствора теллурита калия осадок при росте грибов рода *Candida spp.* приобретал темно-серый цвет, что является дополнительным диагностическим признаком (рис. 3).

При определении плесневых грибов и дрожжей в пищевых продуктах использовали метод прямого посева в агаризованные среды. Для этого продукт и (или) его разведения высевали в селективную агаризованную питательную среду Сабуро. После инкубации посевов в соответствующих условиях подсчитывали все выросшие видимые типичные по морфологии колонии дрожжей и плесневых грибов.

Питательная среда для выращивания дрожжевых и плесневых грибов сухая (агар Сабуро) (производства ФБУН ГНЦ ПМБ) предназначена для выращивания и подсчета общего числа дрожжевых и плесневых грибов в продуктах питания и других объектах при санитарно-бактериологических исследованиях.

**Специфическая активность.** Агар Сабуро обеспечивал рост тест-штаммов при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения  $10^{-5}$  через  $(45 \pm 3)$  ч инкубации при температуре  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$  на всех засеянных чашках Петри:

• *C. albicans* NCTC 885-653 в виде гладких, выпуклых колоний белого цвета с ровным краем диаметром 2,0–3,0 мм (рис. 4);

• *Aspergillus* – в виде многоядерного мицелия черного цвета (рис. 5).

**Ингибирующие свойства.** Агар Сабуро с внесенным 2% раствором теллурита калия (5,0 мл на 1 л готовой среды) при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения  $10^{-3}$  полностью подавлял рост тест-штаммов *S. aureus* ATCC 6538-Р и *E. cloacae* A-186 через  $(45 \pm 3)$  ч инкубации при температуре  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

В качестве ингибитора также рекомендуется использовать левомицетин (хлорамфеникол) 0,1 г/л, который ингибирует подавляющее большинство сопутствующих бактерий, способствуя выделению патогенных грибов при анализе образцов, сильно загрязненных сопутствующей

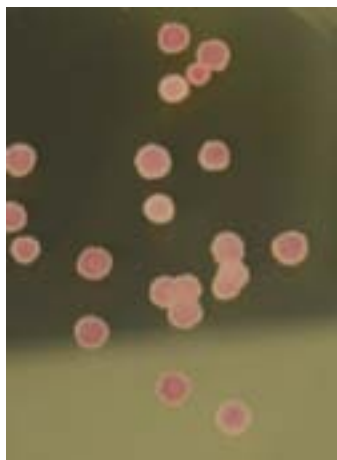


Рис. 7. Рост тест-штамма *C. krusei* ATCC 6258 DSM 6128.

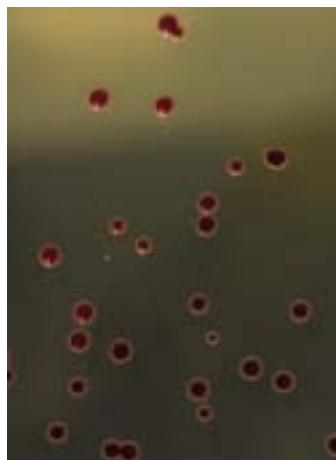


Рис. 8. Рост тест-штамма *C. parapsilosis* ATCC 22019 DSM 5784.

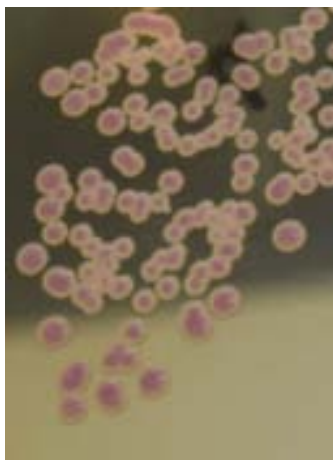


Рис. 9. Рост тест-штамма *C. glabrata* ATCC 90030 DSM 11226.

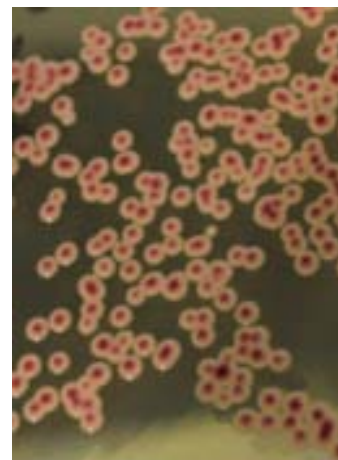


Рис. 10. Рост тест-штамма *C. albicans* NCTC 885-653.

микрофлорой. Антибиотик широкого спектра действия термоустойчив.

При посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения  $10^{-5}$  через  $(45 \pm 3)$  ч инкубации при температуре  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$  тест-штамм *S. albicans* NCTC 885-653 на агаре Сабуро с хлорамфениколом растет в виде гладких, выпуклых колоний белого цвета с ровным краем, диаметром 2,0–3,0 мм (рис. 6). На среде полностью подавляется рост тест-штаммов *S. aureus* ATCC 6538-P и *E. cloacae* A-186 при посеве по 0,1 мл микробной взвеси каждого тест-штамма из разведения  $10^{-3}$  через  $(45 \pm 3)$  ч инкубации при температуре  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

Для определения фосфолипазной активности (ФЛА) делали высев на чашки с плотной средой Сабуро с добавлением яичного желтка. Посевы выдерживали в термостате в течение 2 сут при температуре  $37^\circ\text{C}$ . О наличии ФЛА и степени ее выраженности, определяющей вирулентность грибов *S. albicans*, судили по образованию зоны опалесцирующего просветления («венчика») вокруг колоний.

Хромогенные питательные среды позволяют предварительно дифференцировать различные виды кандид. Различные производители хромогенных питательных сред, вероятно, используют различные хромогенные субстраты, что осложняет интерпретацию полученных результатов. В качестве дополнительных методов используют тесты, с помощью которых можно обеспечить достаточно быстрый по времени скрининг культур *Candida* до вида. Для этой цели прибегают к тесту филаментации (герминации), выявлению наличия или отсутствия роста культур на агаре с циклогексимином, а также по окраске колоний при выращивании на среде Сабуро с 2,3,5-трифенилтетразолия хлоридом [19].

Для такого исследования была приготовлена питательная среда на основе среды Сабуро с хлорамфениколом, в состав которой добавлен 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид в количестве 0,1 г/л.

Через  $(45 \pm 3)$  ч инкубации при температуре  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$  в результате посевов ряда тест-штаммов определяли характер роста: колонии тест-штамма *C. krusei* ATCC 6258 DSM 6128 матовые, с неровным краем, слегка розового цвета (рис. 7); колонии *C. parapsilosis* ATCC 22019 DSM 5784 – гладкие, блестящие, розово-красного цвета (рис. 8); колонии *C. glabrata* ATCC 90030 DSM 11226 – слизистые, блестящие выпуклые розового цвета (рис. 9); колонии *S. albicans* NCTC 885-653 – гладкие, блестящие кремового цвета с розовым центром (рис. 10).

Таким образом, по морфологической оценке на среде Сабуро с 2,3,5-трифенилтетразолия хлоридом можно предположительно идентифицировать культуры грибов *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* или *S. albicans*.

## Выводы

Несмотря на большое количество питательных сред для выделения дрожжевых и плесневых грибов, на сегодняшний день нет ни одной универсальной среды для выделения и количественного определения всех видов дрожжей и плесеней для всех возможных пищевых продуктов. Поэтому рекомендуется применять различные питательные среды. В то же время выбор только высокочувствительной пита-

тельной среды позволит дать объективную и достоверную оценку качества продукта и повысить уровень микробиологических исследований. Среда Сабуро, выпускаемые ФБУН ГНЦ ПМБ, обеспечивают четкие морфологические признаки, являющиеся основой дифференциальной диагностики грибов рода *Candida* от других дрожжеподобных грибов, плесневых грибов и микробов-ассоциантов.

## Литература

1. ГОСТ Р 51705.1-2001. Системы качества. Управление качеством пищевых продуктов на основе принципов ХАССП. Общие требования.
2. Красникова ЛВ, Гунькова ПИ. Микробиологическая безопасность пищевого сырья и готовой продукции: Учеб.-метод. пособие. 2014, с. 91.
3. СанПиН 2.3.2.1078-01. «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» (с изменениями на 6 июля 2011 года).
4. ТР ТС 021/2011 О безопасности пищевой продукции.
5. ТР ТС 023/2011 На соковую продукцию.
6. ТР ТС 033/2013 О безопасности молока и молочной продукции.
7. Плесневые грибы и дрожжи. Строение плесневых грибов [Электронный ресурс]. Доступно по: [https://www.syl.ru/article/167563/new\\_plesnevyye-griby-i-drojji-stroenie-plesnevyyih-gribov](https://www.syl.ru/article/167563/new_plesnevyye-griby-i-drojji-stroenie-plesnevyyih-gribov)
8. Соколов ДМ, Соколов МС. Ускоренный метод определения дрожжей и плесеней с использованием петрифильмов 3М™ Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate. Молочная промышленность. 2014;(5):43.
9. Шепелин АП, Новиков СА, Полосенко ОВ, Шолохова ЛП, Марчихина ИИ. Питательные среды для микологических исследований. Проблемы медицинской микологии. 2018;20(2):130.
10. Джей ДжМ, Лесснер МДж, Голь ДА. Современная пищевая микробиология. Том 2. М.: Бином; 2012, с. 43-48.
11. ГОСТ Р ISO 7218-2015. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям.
12. ГОСТ 10444.12-2013. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества дрожжей и плесневых грибов.
13. ГОСТ 28805-90. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества осмотоерантных дрожжей и плесневых грибов.
14. ГОСТ 30706-2000. Продукты молочные для детского питания. Метод определения количества дрожжей и плесневых грибов.
15. ГОСТ ISO 21527-1-2013. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Метод подсчета дрожжевых и плесневых грибов. Часть 1.
16. ГОСТ Р ISO 21527-2-2013. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Метод подсчета дрожжевых и плесневых грибов. Часть 2.
17. Методические рекомендации. Методы выявления дрожжей и плесневых грибов в пищевых продуктах: № 24 ФЦ/900. М., 2004.
18. Кисленко ВН, Дячук ТИ. Пищевая микробиология: микробиологическая безопасность сырья и продуктов животного и растительного происхождения. М., 2018, с. 95.
19. Методические рекомендации. Грибы рода *Candida*. Методы выделения, идентификации на видовом уровне и определение чувствительности к противогрибковым препаратам. М., 2009, с. 56.

## References

1. GOST R 51705.1-2001. Quality system. Food quality management based on HACCP principles. General requirements
2. Krasnikova LV, Gun'kova PI. Mikrobiologicheskaya bezopasnost' pishchevogo syr'ya i gotovoy produktsi. 2014, p. 91.

3. SanPiN 2.3.2.1078-01. Hygienic requirements for food safety and nutritional value" (as amended on July 6, 2011).
4. TR TS 021/2011 on food safety.
5. TR TS 023/2011 Juice products.
6. TR TS 033/2013 On the safety of milk and dairy products.
7. Plesneveye griby i drozhzhi. Stroenie plesnevnykh gribov. Available at: [https://www.syl.ru/article/167563/new\\_plesnevnye-gribyi-i-drojji-stroenie-plesnevnykh-gribov](https://www.syl.ru/article/167563/new_plesnevnye-gribyi-i-drojji-stroenie-plesnevnykh-gribov)
8. Sokolov DM, Sokolov MS. Uskorenniy metod opredeleniya drozhzhei i plesenei s ispol'zovaniem petrifil'mov 3M™ Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Count Plate. Molochnaya promyshlennost'. 2014;(5):43.
9. Shepelin AP, Novikov SA, Polosenko OV, Sholokhova LP, Marchikhina II. Pitatel'nye sredy dlya mikologicheskikh issledovaniy. Problems in Medical Mycology. 2018;20(2):130.
10. Dzhei DzhM, Lessner MDzh, Gol' DA. Sovremennaya pishchevaya mikrobiologiya. Vol. 2. Moscow: "Binom" Publ.; 2012, pp. 43-48.
11. GOST R ISO 7218-2015. Microbiology of food and animal feed. General requirements and recommendations for microbiological studies.
12. GOST 10444.12-2013. Microbiology of food and animal feed. Methods for identifying and counting the number of yeasts and fungi.
13. GOST 28805–90. Food. Methods of detection and determination of the amount of osmotolerant yeast and fungi.
14. GOST 30706–2000. Dairy products for baby food. Method for determining the amount of yeast and fungi.
15. GOST ISO 21527-1-2013. Microbiology of food and animal feed. Method of counting yeast and mold fungi. Part 1.
16. GOST R ISO 21527-2–2013. Microbiology of food and animal feed. Method of counting yeast and mold fungi. Part 2.
17. Methodical recommendation. Methods of detection of yeast and mold fungi in food: №24 ФЦ /900. Moscow, 2004.
18. Kisenko VN, Dyachuk TI. Pishchevaya mikrobiologiya: mikrobiologicheskaya bezopasnost' syr'ya i produktov zhivotnogo i rastitel'nogo proiskhozhdeniya. Moscow, 2018, p. 95.
19. Methodical recommendation. Fungi of the genus Candida. Methods of isolation, identification at the species level and determination of sensitivity to antifungal drugs. Moscow, 2009, p. 56.

#### Информация об авторах:

Полосенко Ольга Вадимовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник сектора микробиологических исследований лаборатории микробиологических и физико-химических методов анализа НПО ПС ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0020  
E-mail: polosenko@obolensk.org

Марчихина Ирина Ивановна, заведующая лабораторией микробиологических и физико-химических методов анализа НПО ПС ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0020  
E-mail: marchikhina@obolensk.org

Шолохова Любовь Петровна, заведующая сектором подготовки тест-штаммов НПО ПС ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0017  
E-mail: sholohovalp@obolensk.org

#### Information about authors:

Olga V. Polosenko. PhD in Biology, leading researcher, microbiological research sector, laboratory of microbiological and physico-chemical methods of analysis, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0017  
E-mail: polosenko@obolensk.org

Irina I. Marchikhina, head of the laboratory of microbiological and physico-chemical methods of analysis, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0020  
E-mail: marchikhina@obolensk.org

Lyubov P. Sholokhova, head of the test strain preparation sector, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0020  
E-mail: sholohovalp@obolensk.org

## НОВОСТИ НАУКИ

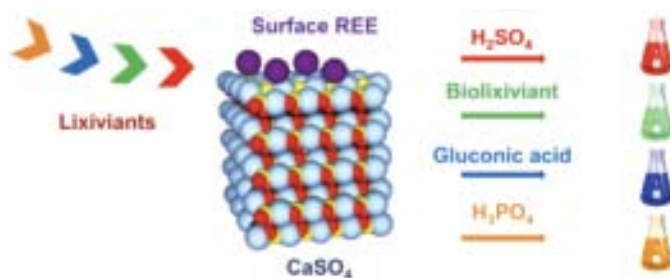
### Ученые опробовали новый способ добычи редкоземельных металлов. Их можно извлекать из отходов производства!

Редкоземельные металлы – это 17 элементов (скандий, иттрий, лантан и лантаноиды), сходных по ряду физико-химических свойств. Они широко используются в магнитах, катализаторах, люминофорах и новых технологиях экологически чистой энергии. В природе эти элементы часто связаны с отложениями фосфатов (главным образом в Китае и Японии). Одним из потенциальных их источников является фосфогипс, отход от производства фосфорной кислоты для производства удобрений. Содержание редкоземельных металлов в этих отходах покрыло бы 80% от потребностей рынка.

Известно, что биологическое выщелачивание металлов из некоторых видов сырья можно проводить с использованием органических кислот (глюконовая кислота), продуцируемых гетеротрофными микроорганизмами.

Ученым из американского Ратгерского университета удалось извлечь ряд редкоземельных элементов из лабораторного фосфогипса.

В случае успешного продолжения этих опытов искусственный синтез этих элементов снизит стоимость электронных устройств и устранил естественный монополизм их производства.



Antonick P.J., et al.

Bio- and mineral acid leaching of rare earth elements from synthetic phosphogypsum. *The Journal of Chemical Thermodynamics*. 2019;132:491–496.

# Ботулизм: характеристика возбудителя и лабораторные методы его диагностики

Б.В.Ерусланов, Э.А.Светоч, И.П.Мицевич, Н.К.Фурсова, И.А.Дятлов

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

Ботулизм – нервно-паралитическое заболевание человека и животных, вызываемое нейротоксинами (ботулотоксинами) *Clostridium botulinum* и некоторыми другими нейротоксинпродуцирующими клостридиями. Обзор посвящен анализу свойств различных фенотипических групп *C. botulinum* и клостридий видов *C. argentinense*, *C. butyricum* и *C. baratii*. Представлены данные о типах и субтипах токсинов, продуцируемых *C. botulinum*, об их структуре и механизмах патогенетического действия. Описаны формы ботулизма у человека: пищевой, раневой, младенческий и ятрогенный. Дан анализ современных лабораторных методов детекции возбудителя ботулизма: биологических, иммунологических и молекулярно-генетических. Сделан вывод о необходимости разработки отечественных молекулярно-генетических и других диагностических тест-систем для индикации нейротоксинов *C. botulinum*.

**Ключевые слова:** ботулизм, *Clostridium botulinum*, лабораторные методы, диагностика

**Для цитирования:** Ерусланов Б.В., Светоч Э.А., Мицевич И.П., Фурсова Н.К., Дятлов И.А. Ботулизм: характеристика возбудителя и лабораторные методы его диагностики. Бактериология. 2018; 3(4): 47–59. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-47-59

## Botulism: characterization of the pathogen and the laboratory diagnostic methods

B.V.Eruslanov, E.A.Svetoch, I.P.Mitsevich, N.K.Fursova, I.A.Dyatlov

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

Botulism is a neuro-paralytic disease of humans and animals caused by *Clostridium botulinum* neurotoxins (botulinum toxins) and some other neurotoxin-producing clostridia. The review is devoted to the analysis of the properties of various *C. botulinum* phenotypic groups and other clostridial species: *C. argentinense*, *C. butyricum*, and *C. baratii*. The data on the types and subtypes of toxins producing by *C. botulinum*, about their structure and pathogenetic mechanisms of action are presented in the review. The forms of botulism in humans are described: food, wound, infant and iatrogenic. The analysis of modern laboratory methods for the detection of botulism agent are presented: biological, immunological and molecular genetics. The conclusion is the necessity to develop the domestic molecular-genetic and other diagnostic test-systems for the indication of *C. botulinum* neurotoxins.

**Keywords:** botulism, *Clostridium botulinum*, laboratory methods, diagnostics

**For citation:** Eruslanov B.V., Svetoch E.A., Mitsevich I.P., Fursova N.K., Dyatlov I.A. Botulism: characterization of the pathogen and the laboratory diagnostic methods. Bacteriology. 2018; 3(4): 47–59. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-47-59

**Б**отулизм – тяжелое нервно-паралитическое заболевание человека и животных, симптомы которого впервые описаны в медицинской литературе в конце XVII – начале XVIII вв. Первые вспышки заболевания среди людей были связаны с употреблением кровяной и ливерной колбас. В дальнейшем сходные симптомы болезни отмечали также у людей, употреблявших копченую ветчину, соленую рыбу, заготовленные впрок овощи и фрукты. В 1897 г. бельгийский ученый Э. ван Эрменгем показал, что нервно-паралитические синдромы связаны с бактериальными токсинами:

из остатков съеденной ветчины, а также из селезенки и толстой кишки умершего человека исследователь выделил спорообразующую анаэробную культуру микроба, фильтраты питательной среды которой вызывали у морских свинок, кроликов, кошек, голубей и обезьян заболевание с летальным исходом. По предложению Э. ван Эрменгема это заболевание было названо ботулизмом (от латинского *botulus* – колбаса), а выделенная культура получила название *Bacillus botulinus*, по современной номенклатуре – *Clostridium botulinum* [1].

### Для корреспонденции:

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 район, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПИМБ  
Телефон: (4967) 36-0079  
E-mail: fursova@obolensk.org

Статья поступила 24.10.2018 г., принята к печати 25.12.2018 г.

### For correspondence:

Nadezhda K. Fursova, PhD (Biology), leading researcher of the antimicrobial agents laboratory, the molecular microbiology departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

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

The article was received 24.04.2018, accepted for publication 25.12.2018



### Характеристика возбудителя ботулизма

*C. botulinum* – грамположительные палочковидные анаэробные спорообразующие подвижные бактерии, принадлежащие к роду *Clostridium* (рис. 1). Таксономическим признаком этих бактерий является их способность синтезировать ботулинический нейротоксин (ботулотоксин), вызывающий у человека и животных ботулизм. К настоящему времени у *C. botulinum* описаны и хорошо изучены семь типов ботулотоксинов: А, В, С, D, Е, F и G. Недавно идентифицирован новый восьмой серотип токсина – H-тип, называемый еще мозаичным токсином F/A. Серотипы токсинов А, В, Е и F имеют подтипы. Помимо *C. botulinum*, ботулотоксины типов Е и F продуцируют соответственно клостридии видов *C. argentinense*, *C. butyricum* и *C. baratii*. На основании типов и субтипов ботулотоксинов, культуральных, ферментативных и генетических свойств, а также особенностей экологии ботулотоксинпродуцирующие клостридии подразделяются на шесть фенотипических групп, существенно отличающихся друг от друга (табл. 1). Клостридии групп I, II, IV, V и VI вызывают ботулизм у человека, а группы III – у животных. Важно отметить, что *C. botulinum* фенотипических групп I, II и III генетически близки с нетоксигенными клостридиями соответственно видов *C. sporogenes*, *C. beijerinckii* и *C. novyi*, а токсин-образующий вид *C. argentinense* близок по свойствам к нетоксигенным клостридиям вида *C. subterminale*. Указанное родство между видами клостридий необходимо учитывать при культуральных методах выделения возбудителя ботулизма из исследуемого материала [2].

*C. botulinum* повсеместно присутствует в окружающей среде: в почве, в пыли, в прибрежных отложениях морей, рек и озер, водно-болотных угодий, где споры сохраняются десятилетиями. Загрязненные почвы, морские и речные отложения являются основной экологической нишей для спор *C. botulinum* и могут служить первоначальным источником для распространения патогена на территории проживания чело-

века. Другим резервуаром *C. botulinum* для человека являются домашние и дикие животные, мало восприимчивые к токсинам *C. botulinum*: свиньи, собаки, кошки, львы, грифы и т.д., в содержимом кишечника которых может находиться патоген. Серьезным резервуаром *C. botulinum* являются также речная и морская рыба, водоросли, водные растения и простейшие. Формированию территорий с повышенным содержанием *C. botulinum* способствуют разлагающиеся тушки погибшей от ботулизма водоплавающей птицы, трупы грызунов, крупных диких животных. Размножение *C. botulinum* и накопление ботулотоксинов может происходить в гниющей растительной массе, других органических отходах, а также в сточных водах с большим содержанием органических веществ. Условия окружающей среды, такие как температура, оптимальная для роста *C. botulinum* (25–42°C), мелководные щелочные воды с многочисленными популяциями беспозвоночных и разлагающимися тушками животных, также способствуют накоплению *C. botulinum* на определенных территориях.

### Ботулинические нейротоксины

Ботулотоксины являются чрезвычайно мощными нейротоксинами. Смертельная доза для человека весом 70 кг при оральном пути попадания в организм равна 70 мкг, при вдыхании – 0,8–0,9 мкг, при внутривенном введении – 0,09–0,15 мкг [3]. Ботулотоксины представляют собой цинксодержащие эндопептидазы, длина которых колеблется от 1251 а.к. (ботулотоксин Е) до 1296 а.к. (ботулотоксин А). Они синтезируются бактериями в виде одноцепочечных полипептидов с молекулярной массой 150 кДа, высвобождаются после лизиса бактерий, а затем расщепляются путем протеолитического гидролиза бактериальными или тканевыми протеазами до активного токсина, который состоит из легкой (LC, 50 кДа) и тяжелой (HC, 100 кДа) цепей, связанных дисульфидной связью [4]. С-концевой домен HC молекулы отвечает за связыва-

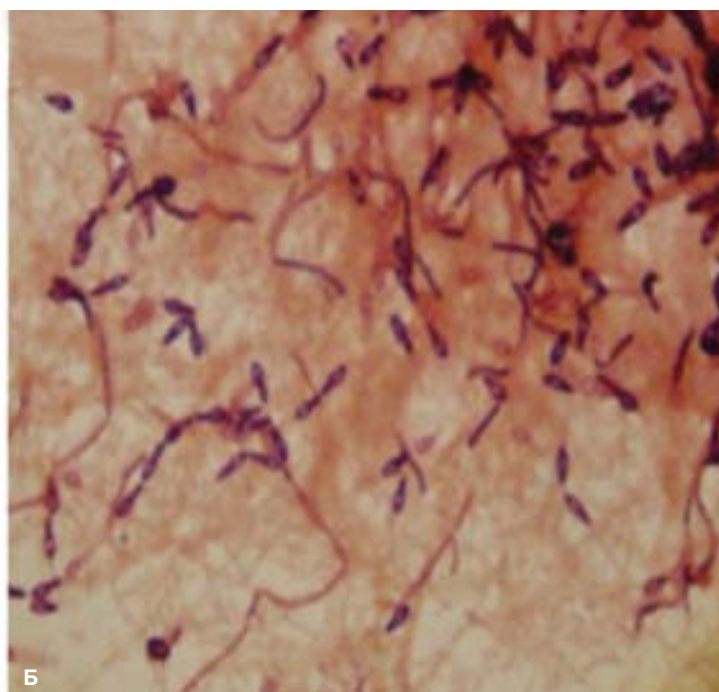


Рис. 1. Микрофотография клеток *C. botulinum*: А – сканирующий электронный микроскоп  $\times 13\,300$ ; Б – окраска по Граму культуры, выращенной на плотной питательной среде  $\times 1150$  [63].

ние с рецептором мембраны нервных клеток и интернализацию молекул токсина посредством эндоцитоза, N-концевой домен HC – за перемещение токсина из эндосомального пузырька в нервную клетку, позволяя LC-каталитическому домену цинксодержащей эндопептидазы переноситься в цитоплазму, где находится мишень его действия (рис. 2).

Основной патогенетический механизм действия ботулотоксина заключается в торможении высвобождения ацетилхолина в терминалях холинергических нейронов в районе нервно-мышечного взаимодействия, что предотвращает передачу нейротрансмиттеров и подавляет сокращение мышц, вызывая у них вялый паралич. Патогенетический механизм токсина реализуется поэтапно: вначале тяжелая цепь ботулотоксина связывает молекулу со специфическим

рецептором на мембране терминаля аксона, причем токсин каждого серотипа имеет свой уникальный рецептор; далее, за счет рецепторопосредованного эндоцитоза, токсин попадает в терминаль аксона с одновременным образованием пузырька – интернализация [5]. На последующем этапе легкая и тяжелая цепи нейротоксина разделяются, и легкая цепь выходит в цитоплазму клетки – мембранная транслокация. Попавшая в цитозоль терминаля аксона легкая цепь нейротоксина при помощи цинксодержащих специфических протеаз вызывает гидролиз синаптоматально-ассоциированных SNARE-белков, предотвращая образование транспортного комплекса, и тем самым блокирует высвобождение ацетилхолина из синаптического пузырька в синаптическую щель, что приводит к расслаблению мышцы (рис. 3).

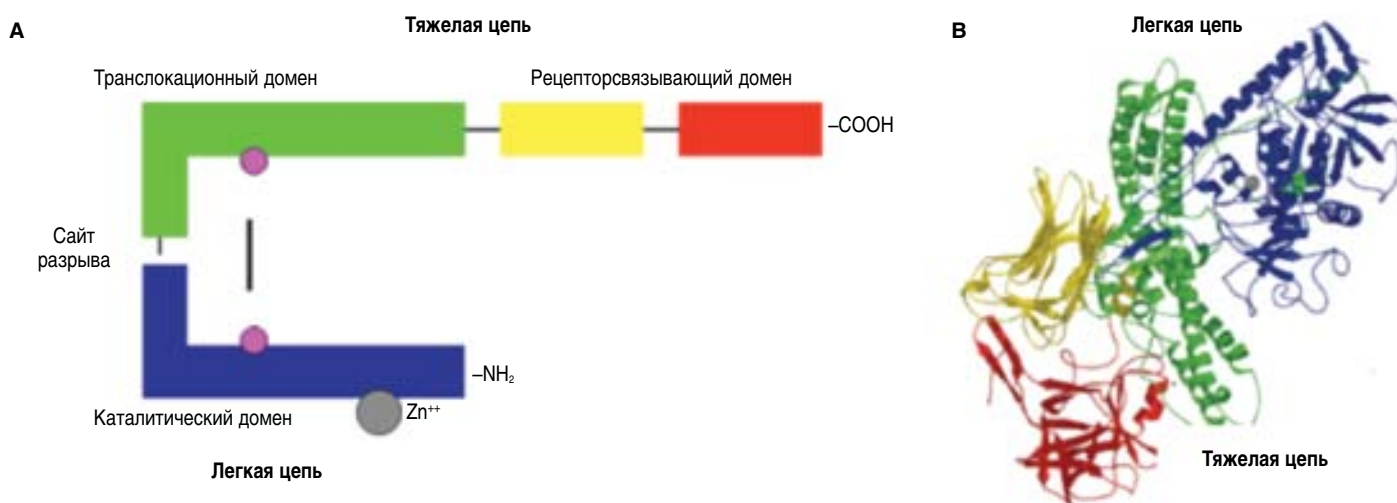


Рис. 2. Структура ботулотоксина: А – схема строения; В – модель третичной структуры белка [64].

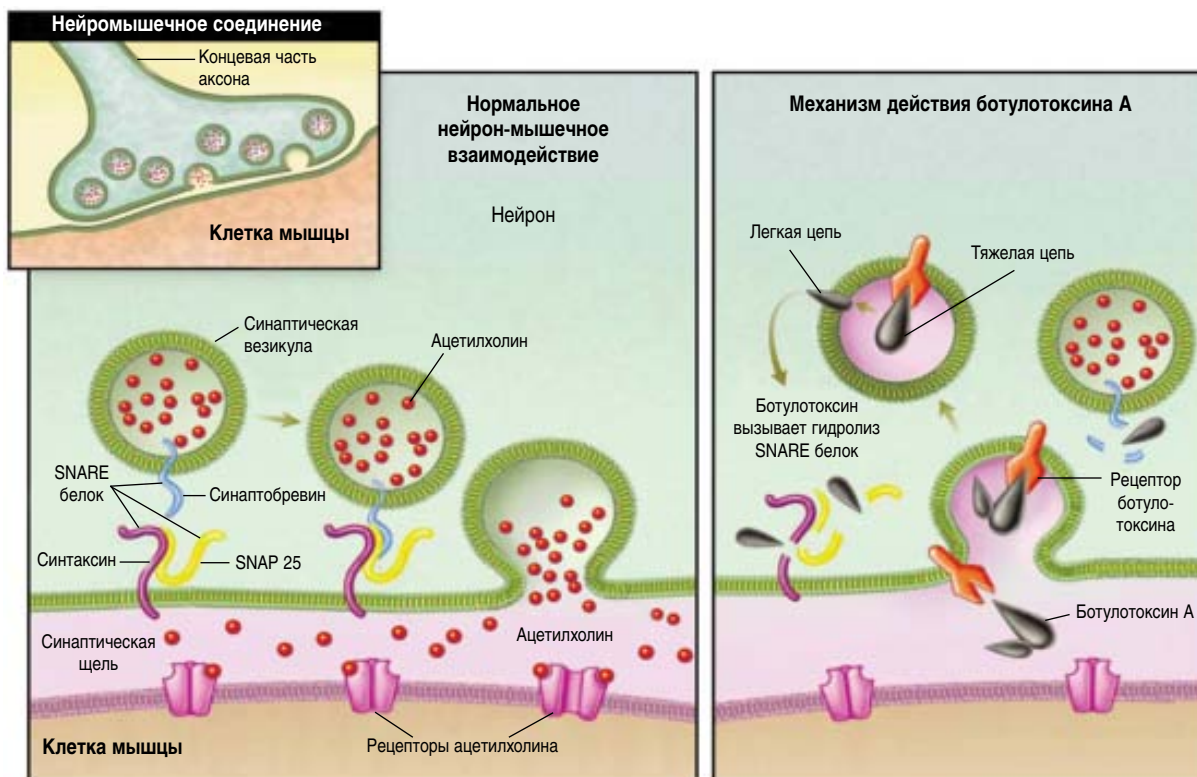


Рис. 3. Механизм патогенетического действия нейротоксина *C. botulinum* [6].

Каждый серотип ботулотоксина (анатоксина), имея характерный только для него состав и последовательность аминокислот в полипептидной цепи (разница у разных типов нейротоксинов может достигать 70%), индуцирует в макроорганизме образование специфических нейтрализующих антител, при этом антитела, специфичные к одному типу токсина, не могут нейтрализовать нейротоксины другие типов.

Нейротоксины типов А, В, Е и F подразделяются на 41 субтип, которые могут различаться между собой структурой аминокислотных последовательностей на 2,6–31,6%. Эти различия могут влиять на аффинность и каталитическую эффективность токсинов по отношению к их субстрату, а также на активность связывания и нейтрализации их моноклональными и поликлональными антителами. Ботулотоксин типа А существенно отличается по своей специфичности от ботулотоксинов всех других типов; нейротоксины С, D, C/D и D/C близки друг другу, так же как и нейротоксины серотипов В/G и E/F. Недавно обнаруженный нейротоксин типа Н по своей специфичности находится между серотипами F и А [6].

Отдельные штаммы *C. botulinum* могут продуцировать несколько нейротоксинов. Имеются сообщения о штаммах *C. botulinum* с двумя типами токсинов. В таких штаммах два нейротоксина обычно продуцируются в разных количествах: Аа, Ва, Af и Bf, где заглавными буквами обозначены преобладающие типы токсина. Так, у штаммов *C. botulinum*, продуцирующих нейротоксины типов Ва и Bf, токсина В продуцируется в 10 раз больше, чем токсинов А или F соответственно [7]. Описаны штаммы *C. botulinum*, продуцирующие нейротоксин А и несущие в своих геномах неактивные гены токсина В, такие штаммы обозначают как А(В) [8]. Неактивный ген токсина В был обнаружен и у нетоксигенной культуры *C. subterminale* [9]. Недавно описан штамм *C. botulinum*, экс-

прессирующий одновременно три нейротоксина: хромосомные А2 и F4 токсины и плазмидный токсин F5 [7].

Бактерии *C. botulinum* фенотипической группы III, кроме нейротоксинов С и D, продуцируют также токсины C/D и D/C, которые представляют собой мозаичные токсины, возникающие, как считается, в результате генетической рекомбинации между генами синтеза токсинов С и D (табл. 1). К мозаичным токсинам относится и недавно описанный нейротоксин Н, представляющий собой гибридоподобную структуру, содержащую области двух токсинов – А1 и F5 [10].

### Генетика *C. botulinum*

К настоящему времени в базе данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) размещены нуклеотидные последовательности геномов 107 штаммов *C. botulinum*, что свидетельствует о большом генетическом разнообразии данного патогена. Геномы *C. botulinum* представлены кольцевыми ДНК, длины которых для разных фенотипических групп различны (табл. 1). Большинство токсигенных штаммов *C. botulinum* имеют плазмиды и профаги, размеры которых варьируют от 16 до 270 Kb. Содержание ГЦ у большинства видов клостридий одинаково.

Бактерии *C. botulinum* разных фенотипических групп имеют генетическое и физиологическое родство с определенными видами нетоксигенных клостридий (см. табл. 1) [11]. Ген *bont*, кодирующий синтез ботулотоксина, имеет длину приблизительно 3,8 т.п.н. Его нуклеотидная последовательность сходна с геном коллагеназы, что позволяет предположить, что они произошли от общего предка [12]. Различия в нуклеотидных последовательностях токсинов типов А-Н составляют 24,5–44,7% (см. табл. 1). Аминокислотные последовательности каждого подтипа отличаются от других не менее чем на 2,1%. Подтипы нейротоксинов подразде-

Таблица 1. Фенотипические группы *Clostridium botulinum* и их характеристика [4]

Основные свойства	<i>C. botulinum</i> группа I	<i>C. botulinum</i> группа II	<i>C. botulinum</i> группа III	<i>C. argentinense</i> группа IV	<i>C. butyricum</i> группа V	<i>C. baratii</i> группа VI
Типы нейротоксинов	А, В, F, H	В, Е, F	С, С/D, D, D/C	G	E	F
Субтипы	A1; A2; A3; A4; A5; A6; A7; A8; A9; A10; B1; B2; B3; B5 (Ba); B6; B7; A(B); Ab; Af; Af84; Bf; F1; F2; F3; F4; F5	B4; E1; E2; E3; E6; E7; E8; E9; E10; E11; F6	C; D; CD; DC		E4; E5	F7
Экологическая ниша	Почва	Водная среда	Почва	Почва	Водная среда	Почва
Размер генома, Mbp	3,9–4,1	3,6–4,1	3,2–4,0	3,5–4,2	3,7–4,1	3,6–4,1
GC содержание в геноме, %	26–28	26–28	24–27	26–28	23–27	26–28
Генетическое разнообразие	Ограниченное	Широкое				
Генетическое родство с нетоксигенными видами	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. beijerinckii</i>	<i>C. novyi</i>	<i>C. subterminale</i>	Нетоксигенные <i>C. butyricum</i>	Нетокси-генные <i>C. baratii</i>
Протеолитическая активность	+	–	–	+	–	–
Липазная активность	+	+	+	–	–	–
Лецитиназная активность	–	–	+	–	–	–
Оптимальная температура роста, °C	37	25	40	37	30–37	30–45
Минимальная температура роста, °C	10–12	2,5	15		12	10–15
Резистентность спор к нагреванию*	D104°C, 2,22 мин	D82,2°C, 2,4 мин	D104°C, 0,9 мин	D104°C, 1,1 мин	D100°C, <0,1 мин	
Рост ограничен при pH	4,3–4,5	5,0–5,1	4,3–4,5	5,3–5,5	5,0–5,1	4,3–4,5
Рост ограничен при концентрации NaCl в водной фазе, %	10	5	10	7	5	5
Передача клостридий через продукты	Овощи, мясо, консервы, мед	Рыба, мясо, и минимально обработанные, упакованные продукты	Овощи, мясо, консервы	Овощи, мясо, консервы	Рыба, овощи	Овощи, мясо, консервы

\*DT, десятично снижаемое время при температуре T.

ляются на протеолитические токсины – А1–А8, В1, В2, В3, В5 (Ва), В6 и В7 и непротеолитические – В5, С, С/Д, D, D/С, Е1–Е11, F1–F7 и G, а также новый тип Н (F/A) [13]. Между генами подтипов токсинов имеется 92–95% идентичности нуклеотидных последовательностей, что соответствует 84–90% идентичности аминокислотных последовательностей. Среди генов подтипов В нуклеотидные последовательности различаются на 2–4%, а аминокислотные – на 3–6% [14]. Гены мозаичных токсинов С/Д и D/С отличаются от генов классических типов С и D тем, что гены каталитической активности у них, соответственно, представлены генами С и D, а гены активности связывания токсина с рецептором – генами D и С [7]. Нуклеотидные последовательности гена токсина Е имеют 12 подтипов, 10 из которых имеют 99% идентичности нуклеотидных последовательностей 97–99% идентичности аминокислот [15]. Внутри группы генов подтипов токсина F нуклеотидные последовательности различаются между собой довольно существенно (до 25%) и, в свою очередь, подразделяются на семь подтипов. Последовательности генов *bont* подтипов F1–F5 и F6 образуют кластер, отличающийся от кластера подтипа F7 [16]. Небольшое количество доступных штаммов, продуцирующих нейротоксин D, не позволяет оценить разнообразие генов этого токсина.

Гены ботулотоксинов могут быть локализованы на разных генетических элементах бактериальной клетки – в хромосоме, в профагах и на плаزمиде [17]. Гены нейротоксинов протеолитических и непротеолитических *C. botulinum* I и II фенотипических групп находятся либо на хромосоме, либо на плазмиде [18]. У *C. botulinum* III и IV фенотипических групп гены нейротоксинов располагаются соответственно в бактериофаге и на плазмиде [19, 20]. Геномный анализ бактериофагов *C. botulinum* группы III, кодирующих нейротоксины типов С, С/Д, D и D/С, показал, что эти фаги являются кольцевыми плазмидными профагами, которые не интегрированы в хромосому хозяина; токсин продуцируется во время лизогенного состояния фага [21]. Локус *bont* E *C. botulinum* фенотипической группы V расположен на плазмиде, тогда как локус *bont* F в клетках *C. baratii* фенотипической группы VI расположен на хромосоме [22].

Установлено, что ген *bont* локализован в строго определенных локусах хромосомы или плазмид *C. botulinum*. У штаммов I и II фенотипических групп это три специфических сайта: оперон *ars*, участвующий в восстановлении мышьяка, оперон *oppA/brnQ*, кодирующий транспорт аминокислот, и ген *rarA*, кодирующий синтез резольвазы, участвующей в рекомбинационных событиях и в процессе инсерции транспозонов. Именно рекомбинационные процессы, а также возможный горизонтальный перенос генов между клостридиями с помощью IS-элементов и транспозонов объясняют множественность типов и подтипов нейротоксинов у *C. botulinum*, циркулирующих в природе.

### Клинические формы ботулизма

В зависимости от источника и пути проникновения ботулотоксина в организм человека, болезнь подразделяют на две категории: классический пищевой ботулизм и ботулизм как токсикоинфекция (ботулиническая токсикоинфекция). Последняя, в свою очередь, включает раневой ботулизм, детский

ботулизм и ботулизм, возникающий при колонизации кишечника взрослых людей бактериями *C. botulinum* (рис. 4).

Классический пищевой ботулизм развивается у человека в результате приема пищевых продуктов, содержащих ботулотоксины, наработанные *C. botulinum* или другими нейротоксинпродуцирующими клостридиями. Ботулиническая токсикоинфекция возникает при попадании клостридий (но не токсинов) в организм человека через раны или *per os*; клостридии размножаются в тканях или в кишечнике, локально продуцируют нейротоксин, который всасывается в кровь и вызывает системные поражения, аналогичные таковым при пищевом ботулизме. У больных развиваются черепная невралгия и прогрессирующая периферическая мышечная слабость. Зачастую отмечаются тяжелые неврологические нарушения, при лечении приходится использовать искусственную вентиляцию легких. Ботулизм человека чаще всего связан с нейротоксинами *C. botulinum* типов А, В и Е, редко – типов F, G и H. Нейротоксины типов С и D заболевания у человека не вызывают, поскольку плохо всасываются через слизистую кишечника [23].

**Пищевой ботулизм**, вероятно, сопровождал человечество в течение всей его истории [24]. Вспышки или спорадические случаи пищевого ботулизма, как правило, связаны с употреблением приготовленных в домашних условиях консервированных овощей, грибов, рыбных и мясных продуктов, реже – с употреблением некачественных промышленных консервов, приготовленных с нарушением технологии производства. Пищевой ботулизм встречается относительно редко, но в некоторых регионах мира чаще, чем в других, из-за особенностей пищевых традиций. Вспышки ботулизма, вызванные токсинами *C. botulinum* типов А и В, обычно регистрируют в районах с умеренным и теплым климатом: в США, Китае, Южной Америке и странах южной Европы, где традиционно употребляется много овощей. В Центральной Европе ботулизм чаще связан с употреблением консервированных мясных продуктов, вспышки здесь ассоциируются со штаммами *C. botulinum* группы II, продуцирующими ботулотоксин типа В [25]. В таких странах, как Канада, Финляндия, Япония, Норвегия, Швеция, США (Аляска), основной причиной ботулизма является нейротоксин Е [26]. В Российской Федерации отмечаются случаи ботулизма, вызванного нейротоксинами типов А, В, Е и F.

В 1965–1990 гг. в провинции Пуатье (Франция) было зафиксировано 108 случаев пищевого ботулизма [27]. В 2014 г. во Франции было зарегистрировано еще 4 вспышки ботулизма, связанных с употреблением коммерческого соуса песто или домашней ветчины и зеленых бобов. При этом пострадали 11 человек. Недавно сообщалось о вспышке ботулизма в штате Техас, США, в которой пострадали 15 человек, отравившиеся ботулиническим токсином типа А, источником которого явился неправильно хранившийся перец чили [28]. В 2010 г. в США было зарегистрировано 9 случаев пищевого ботулизма, среди которых три случая были связаны с токсином типа А, три случая – с токсином типа В, два случая – с токсином типа Е и один случай – с токсином неустановленного типа. В 2017 г. в США было зарегистрировано два случая ботулизма, вызванного токсинами типов А и Е, которые были связаны с употреблением домашних консервированных персиков и рыбьего жира соответственно.

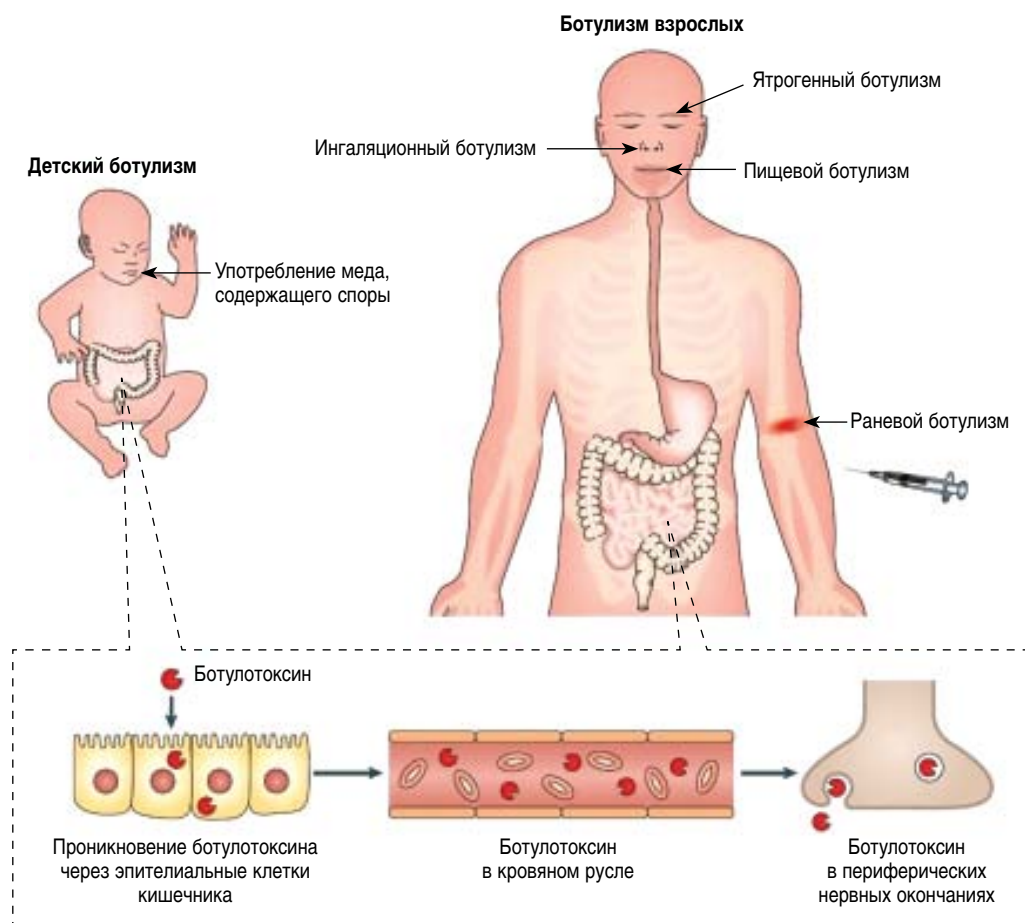


Рис. 4. Клинические формы ботулизма у человека [7].

Заболеваемость ботулизмом в РФ в основном связана с употреблением продуктов домашнего приготовления: вяленой рыбы, консервированных грибов и овощей. Начиная с 2007 г. в РФ ежегодно регистрируется около 300 случаев ботулизма. По информации Роспотребнадзора, в 2007 г. от ботулизма умерли 15, а в 2010 г. – 26 россиян. С января по ноябрь 2011 г. в нашей стране от ботулизма пострадали 160 человек, семь из которых дети; скончались 14 пострадавших. В июле 2015 г., во время вспышки ботулизма в республике Марий Эл, люди отравились ботулотоксином F из консервированных томатов промышленного производства.

**Раневой ботулизм** – редкое заболевание, возникающее вследствие загрязнения ран, в которых создаются условия, близкие к анаэробным. Попавшие в рану споры *C. botulinum* прорастают в вегетативные формы, которые продуцируют ботулотоксины; у пациентов развиваются типичные для ботулизма неврологические расстройства. В последние годы отмечено увеличение заболеваемости раневым ботулизмом среди людей, злоупотребляющих инъекциями наркотических препаратов. Так, в Англии до 1999 г. случаев раневого ботулизма не регистрировалось, в 2000 г. сообщалось о шести случаях раневого ботулизма, а в 2001 г. – о 13 случаях [29]. В США в 2010 г. зафиксировано 17 случаев раневого ботулизма [30]. В РФ сообщений о случаях раневого ботулизма нет.

**Младенческий ботулизм** – крайне редкое заболевание, но отдельные его случаи отмечались во многих странах мира [31, 32]. Чаще всего такие случаи связаны с добавлением

в молоко младенцам пищевых продуктов, например меда, в которых могут присутствовать споры *C. botulinum*, которые, попадая в незрелый кишечник ребенка, прорастают в вегетативные клетки, продуцирующие токсин. Младенческий ботулизм может проявляться в разных формах: от «синдрома гибкого ребенка» до внезапной детской смерти («смерть в кроватке»). Симптомы заболевания являются результатом системного распространения токсина в холинэргических нервных окончаниях. В США в 2010 г. было зарегистрировано 85 случаев младенческого ботулизма в 24 очагах, при этом токсин типа A был обнаружен у 30 пострадавших детей, токсин типа B – у 54 детей и токсин типа F – у одного ребенка. В 2017 г. в США заболели ботулизмом 135 младенцев: 57 случаев болезни были связаны с токсином типа A, 74 случаев – с токсином типа B, три случая – с токсином типа F, один случай – с токсином подтипа Bf [17].

**Другие виды человеческого ботулизма** встречаются крайне редко. Ятрогенный ботулизм может возникать после введения людям лицензированного или нелицензированного токсина для терапевтических или косметических целей [33]. О случаях ингаляционного ботулизма, вызванного вдыханием аэрозоля ботулотоксина, сообщалось в 1961 г. [34].

#### Симптомы и лечение ботулизма

Первые признаки заболевания ботулизмом у человека могут появиться уже через 2 ч после употребления пищи, содержащей ботулотоксин, однако в среднем инкубационный период составляет от 12 до 36 ч, иногда он может про-

должаться несколько суток. Типичными симптомами ботулизма являются нарушение зрения, затрудненное глотание, нарушение речи, паралич мышц лица, нисходящий двусторонний вялый паралич и общая мышечная слабость. Если больного ботулизмом не лечить, это может привести к фатальной дыхательной недостаточности и параличу сердечной мышцы [35].

Быстрая диагностика болезни и наличие хорошо скоординированной междисциплинарной помощи, в том числе применение искусственной вентиляции легких, представляют собой наиболее эффективные меры при лечении ботулизма. Поддерживающее лечение обычно продолжается от нескольких дней до нескольких недель. Единственным специфическим средством лечения ботулизма является антитоксическая сыворотка. Она может остановить прогрессирование паралича и сократить время госпитализации, но только при условии, что сыворотка будет применена не позднее 24 ч после появления первых симптомов болезни, когда нейротоксин еще не попал в постсинаптическое пространство. Следует, однако, заметить, что антитоксическая сыворотка, получаемая от лошадей, в 15–25% случаев ее применения может вызвать у больного тяжелые осложнения, включая сывороточную болезнь и анафилаксию. Как только токсин достигает центральной нервной системы и связывается со своими мишенями, антитоксин становится неэффективным, а полное выздоровление больного занимает месяцы [36]. Смертность от пищевого ботулизма может достигать 5–20%, в то время как смертность при детском и раневом ботулизме в настоящее время составляет примерно 15% и 1% соответственно [37].

### Ботулизм животных

У животных выделяют две основные формы ботулизма: ботулизм, связанный с поеданием корма, в котором накопился ботулотоксин (кормовой ботулизм), и ботулиническая токсикоинфекция, вызываемая прорастанием спор *C. botulinum* и размножением клеток патогена в кишечном тракте или ране животного. Вспышки ботулизма среди сельскохозяйственных и диких животных представляют серьезную экологическую и экономическую проблему из-за возможности формирования локальных очагов, резервуаров *C. botulinum* для человека и высокой смертности среди больных ботулизмом животных и птицы. Чаще всего ботулизмом поражаются крупный рогатый скот, лошади и птица, в том числе водоплавающая. Отмечались случаи массовой гибели рыбы от ботулизма.

У разных видов животных чувствительность к ботулотоксинам различается: крупный рогатый скот наиболее чувствителен к токсину типа D/C, меньше – к токсину D; птица в основном поражается токсином C/D, хотя иногда болезнь может быть вызвана токсинами C и D/C [38]. Мозаичный токсин типа C/D более опасен для цыплят, чем токсин C [39]. У дикой птицы, погибшей от ботулизма, также тестировался в основном токсин типа C/D; у водоплавающей птицы, поедающей зараженную рыбу, – типа E. В пробах рыбы, воды и ила преобладал токсин типа E [39, 40]. Вспышки ботулизма с высоким уровнем смертности, вызванные токсином E у водоплавающей птицы и рыбы, были отмечены в США на Великих озерах [39]. Ботулизм у лошадей может быть вызван токсина-

ми типов B, C или A [41]. Пушные звери, такие как лисы, хорьки и норки, больше всего чувствительны к токсинам C и C/D, редко – к токсинам A и E [42]. Свиньи, по-видимому, обладают естественной устойчивостью к ботулотоксинам, хотя описаны единичные случаи ботулизма у свиней, которые были вызваны токсином типа C. Свиньи могут быть резервуаром *C. botulinum* для человека [43]. Кошки, собаки и дикие звери-падальщики заболевают ботулизмом редко. Устойчивы к ботулизму птицы-стервятники [44]. При изучении ботулизма среди водоплавающей птицы было замечено, что для эпизоотических вспышек характерным является циклическое течение инфекции – цикл птичьего ботулизма. В этом цикле тушка птицы, павшей от ботулизма, вновь становится источником ботулотоксина для другой птицы и окружающей среды, а также источником ботулотоксина для развившихся на тушке личинок мух, при склевывании которых, даже единичной личинки, птицы погибают [45].

Больные сельскохозяйственные животные и птицы, а также животные-бактерионосители *C. botulinum* могут явиться серьезным источником для формирования на отдельных территориях очагов повышенной концентрации *C. botulinum*, что представляет потенциальную опасность для человека. Особенно опасны для человека очаги, которые сформированы животными, чувствительными к тем же типам ботулотоксинов, что и человек, – типов A, B, E и F. В связи со значительной ролью животных в распространении *C. botulinum*, в том числе опасных для человека типов, ряд авторов считают возможным рассматривать ботулизм как зооантропоноз [45].

### Лабораторная диагностика ботулизма

Поскольку ботулизм является весьма опасным для жизни человека заболеванием, ранний и точный диагноз болезни с одновременным определением серотипа нейротоксина, вызвавшего ее, имеет решающее значение для назначения больному соответствующего антитоксина, что во многом определяет успех терапии. В настоящее время в арсенале специалистов имеется достаточно большой набор диагностических тестов, способных быстро и точно идентифицировать ботулотоксин в клиническом материале и продуктах питания (табл. 2).

**Биологические методы диагностики.** Биопроба на мышцах считается «золотым стандартом» для обнаружения и идентификации ботулотоксина. LD<sub>50</sub> нейротоксина для мышей составляет 5–10 пг. Для обнаружения токсина обычно исследуют образцы сыворотки крови больного, содержимое желудочно-кишечного тракта, образцы паренхиматозных органов, материал из раны, пробы пищи, фекалий или образцы из окружающей среды. Мышам внутрибрюшинно вводят проверяемый образец и наблюдают за ними в течение 4 дней, хотя признаки болезни обычно развиваются в течение 6–24 ч после введения материала, содержащего нейротоксин. Типичными симптомами поражения ботулотоксином у мышей являются взъерошенность шерстного покрова, паралич задних конечностей, сокращенный живот («осиная» талия) и затрудненное дыхание. Тип токсина идентифицируют по результатам защищенности мышей от токсина после введения им активных против определенных типов токсинов нейтрализующих антител.

Хотя биопроба считается наиболее высокочувствительным тестом для индикации ботулотоксина, в ряде случаев можно получить ложноотрицательный результат, а именно: если токсин в исследуемых образцах уже разложился или если в пробе сыворотки крови больного токсин обнаружить не удается, поскольку период, в течение которого токсин может тестироваться в крови, короткий. Другим недостатком биопробы является частичная перекрестная реактивность мозаичных типов токсинов. Например, токсин C/D может быть нейтрализован антитоксином типов C и D, а иногда только антитоксином типа D [46]. Кроме того, метод биопробы трудоемок, дорог и создает этические проблемы для исследователей.

Недавно Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов Министерства здравоохранения и социальных служб США (FDA) для замены биопробы предложило использовать метод обнаружения ботулотоксинов с помощью перевиваемых клеток CbrA. Анализ заключается в инкубации клеток с исследуемым материалом в течение определенного периода времени с последующим удалением несвязавшегося токсина и определением его активности в клетках с помощью вестерн-блоттинга или иммуноферментного анализа (ИФА). Предложенный метод превышает чувствительность биопробы и является высокоспецифичным [47].

**Иммунологические тесты.** Наиболее распространенным иммунологическим тестом на ботулотоксины является ИФА. Образцы, в которых предполагается наличие токсина, добавляют к токсинспецифическим поликлональным или моноклональным антителам. Комплексы токсин-антитело выявляют, используя второе токсинспецифическое антитело, связанное с ферментом (фосфатазой или пероксидазой), генерирующим световой сигнал посредством ферментативного расщепления хромогенного субстрата [48]. С развитием методов усиления сигнала ИФА этот метод по чувствительности сравнялся с биопробой. Разработан вариант ме-

тода ИФА для обнаружения нейротоксинов *C. botulinum* типов A, B, E и F. В анализе используют поликлональные антитела, специфичные к указанным типам токсинов, в качестве вторичных антител применяют дигоксигенин (DIG). Этот метод детектирования требует добавления хромогенного субстрата и антител против DIG, конъюгированного с пероксидазой хрена. Чувствительность этого теста для токсина A, обнаруженного в различных образцах пищевых продуктов, составила ~60 пг/мл [49]. Недавно разработан метод ИФА для одновременного обнаружения нейротоксинов серотипов A, B, C, D, E и F с чувствительностью ~0,2 пг/мл [50].

**Иммуно-ПЦР** – это группа сверхчувствительных методов, которые сочетают специфичность распознавания антигенов антителами и чувствительность ПЦР (табл. 2). Метод основан на использовании моноклональных антител, соединенных со специфическими ДНК, контролирующими разные типы ботулотоксинов. Антитело связывается со специфическим нейротоксином, после чего, с помощью реакции амплификации, в полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводится экспоненциальное усиление сигнала. В отличие от ИФА, иммуно-ПЦР позволяет в ходе одного опыта определить сразу большое число различных антигенов, благодаря тому, что после связывания антител с антигенами эти антитела легко могут быть идентифицированы по уникальным олигонуклеотидным последовательностям ДНК, присоединенным к антителам [51]. Исследователи из Франции использовали иммуно-ПЦР для выявления культур *C. botulinum*, продуцирующих токсины типов A, B, E и F, в образцах рыб и донных отложений. Было показано, что *C. botulinum* сравнительно часто (14,5%) встречаются в этих образцах. Чувствительность иммуно-ПЦР для детекции ботулотоксина A, по данным авторов, на несколько порядков превосходит ИФА для определения того же токсина [52].

**Латексная проба** – метод, позволяющий для обнаружения ботулотоксина в исследуемом материале использовать

Таблица 2. Диагностические методы, применяемые для детекции ботулотоксинов

Метод	Время анализа	Тип токсина	Чувствительность	Исследованные образцы	Особенность метода	Ссылки
Биопроба на мышах	1–4 дня	A, B, C, D, E, F, G	20–30 пг/мл	Бактериальная культура, сыворотка крови, фекалии, желудочное содержимое, продукты питания, пробы окружающей среды	Стандартный метод	46
Иммуноферментный метод (ИФА)	8 ч	A, B	4–8 нг/мл	Фекалии, фасоль и грибы	Поливалентные лошадиные антитела	48–50
	8 ч	E, F	0,5–2 нг/мл	Человеческая сыворотка	Поливалентные кроличьи антитела	49
	8 ч	A, B, E	9–45 пг/мл	Загрязненное землей мясо индейки	Поливалентные кроличьи антитела	48
Усиленный ИФА (ELISA-ELCA)	8 ч	A	2–4 пг/мл	Консервированные лосось и солонина	Моноклональные антитела с биотинил-тирамидной системой	49
	8 ч	A	12–14 пг/мл	Бактериальные культуры из сыра, вызвавшего вспышку ботулизма	Поликлональные антитела с биотинил-тирамидной системой	48
	8 ч	A, B, E, F	0,2 нг/мл	Перец чили и картофель	Поликлональные антитела с биотинил-тирамидной системой	51
Иммуно-ПЦР	8 ч	A	5 пг/мл	Очищенный токсин	Моноклональные антитела, связанные с олигонуклеотидами	52
Хемилюминесцентный иммунный блот	6 ч	E	4 пг/мл	Бактериальная культура, загрязненная землей рыба	Поликлональные антитела, меченные люминесцентной меткой	53
Иммунохроматографический метод	15–30 мин	A, B, E	150 пг/мл 10 нг/мл	Молочные продукты, овощи и морепродукты		53
Эндопептидазный тест	6 ч	A, B, D, F	5–10 пг/мл	Треска, мясной фарш, колбасы	Пептидные субстраты, специфичные для SNARE белков. Иммунологическая детекция	55

цветные полистирольные или суперпарамагнитные латексные частицы, сенсibilизированные специфичными антителами против ботулотоксинов. Сенсibilизированные латексные частицы смешивают вместе с исследуемым образцом, в случае наличия в образце токсина выявляют комплекс латексных частиц и токсина с помощью вторых биотинилированных антител против ботулотоксина и конъюгата стрептавидин-фикоэритрина. Образовавшийся комплекс считывают двухлучевым лазерным детектором на основе проточного цитофлуориметра. Один луч лазера классифицирует и определяет наличие токсина, второй – определяет величину сигнала, которая прямо пропорциональна количеству связанного ботулотоксина. Используя данный метод, токсины А и В были обнаружены в образцах пищевых добавок, в которых также содержались примеси других токсинов – холерного токсина, рицина и стафилококкового энтеротоксина В. Чувствительность метода составляет ~21 пг/мл [53].

**Иммунохроматографический анализ (ИХА)** – иммунохимический способ выявления ботулотоксинов, основанный на реакции между гомологичными антителом и антигеном непосредственно в биологическом материале. Осуществляется реакция на специальных тест-полосках, которые погружают в исследуемую жидкость, в которой предполагается наличие ботулотоксина. Жидкость начинает мигрировать вдоль полоски по принципу тонкослойной хроматографии. На тестовой линии полоски иммобилизованы антитела, специфичные к ботулотоксину, а на контрольной линии – антивидовые антитела, специфичные к первичным антителам. Если в образце содержится токсин, происходит его связывание с антителами, конъюгированными с меткой. Затем иммунный комплекс попадает в тестовую зону, где он взаимодействует со вторичными специфичными антителами, образуя «сэндвич» с меткой. Избыток несвязавшегося конъюгата соединяется с антивидовыми антителами на контрольной линии. Появление двух линий на хроматографической полоске является положительным результатом теста. При отсутствии токсина в образце конъюгат связывается с антивидовыми антителами только на контрольной линии, образуя одну линию на тест-полоске. ИХА-тесты просты в исполнении, результаты

регистрируются визуально в течение 15 мин. Разработаны ИХА-тесты для качественного обнаружения ботулотоксинов в пищевых продуктах, их чувствительность находится в диапазоне 5–50 нг/мл [54]. Однако этот метод детекции имеет ограничения из-за сложности получения высококачественных моноклональных антител. Кроме того, генетические изменения в геноме клостридий, касающиеся серотипа токсина, могут привести к снижению аффинности теста и, как следствие, к появлению ложноотрицательных результатов. Другое ограничение метода ИХА состоит в том, что он не способен различать активные и инактивированные токсины.

**Эндопептидазный тест** – это новый метод, основанный на выявлении активности цинксодержащей протеазы ботулотоксина на искусственном специфическом субстрате, содержащем те же сайты гидролиза, что и природные синаптические белки SNARE. Антитела против нейротоксинов *C. botulinum* конъюгируют на поверхности латексных частиц, к ним добавляют образец, предположительно содержащий ботулотоксины А, В или F. В случае их наличия в образце они иммобилизируются соответствующими специфическими антителами. Для того чтобы определить экспрессию активных нейротоксинов, в реакционную смесь добавляют синтетические пептиды, имеющие те же сайты гидролиза, что и белки SNARE. После инкубации активный ботулотоксин ферментативно гидролизует эти белки с образованием пептидов различной молекулярной массы [55]. У каждого серотипа ботулотоксинов есть уникальный сайт гидролиза на SNARE-белках. Фрагменты, полученные в результате расщепления синтетических пептидов, специфичны для каждого типа токсина. Эту специфичность определяют с помощью масс-спектрометрии с лазерной времяпролетной десорбционной ионизацией (MALDI-TOF-MS). Эндопептидазный тест очень чувствителен и высокоспецифичен – позволяет детектировать 40–200 пг/мл ботулотоксина. Такой функциональный подход позволяет обнаруживать активные молекулы токсина и различать типы ботулотоксинов в одном эксперименте.

**Молекулярно-генетические методы** основаны на ПЦР, как в классическом режиме, так и в режиме реального времени. Гены, кодирующие разные типы ботулотоксинов,

Таблица 3. ПЦР-тест-системы, применяемые для обнаружения и идентификации генов синтеза ботулотоксинов *Clostridium botulinum* в исследуемых образцах

Тип образца	Метод	Определяемый тип токсина	Чувствительность	Ссылка
ДНК, выделенная из чистой культуры	ПЦР + гель электрофорез	A, B, E, F	0,3 нг	51
	ПЦР в реальном времени	A, B, C, D, E, F	2,5 пг	
ДНК, выделенная из спор, инокулированных в пищевых продуктах	Мультиплексная ПЦР в реальном времени	A, B, E, F	0,015–0,5 пг	52
	ПЦР в реальном времени	A	10 <sup>2</sup> –10 <sup>3</sup> спор/мл	
ДНК, выделенная из предварительно обогащенных пищевых продуктов	ПЦР + гель электрофорез	A, B, E, F, G	10 клеток/г	51
	ПЦР + гель электрофорез	A, B, E	0,1–21 спор/г	
ДНК, выделенная из предварительно обогащенных пищевых продуктов, образцов внешней среды и клинического материала	ПЦР в реальном времени	A, B, E	10 <sup>2</sup> спор/г	57
	ПЦР в реальном времени	A, B, E, F	10 клеток/г	
ДНК, выделенная из предварительно обогащенных пищевых продуктов и клинического материала	ПЦР в реальном времени	A, B, E, F	10 клеток/г	59, 60
ДНК, выделенная из нагретых и предварительно обогащенных фекалий	Мультиплексная ПЦР в реальном времени	A, B, E, F	10–10 <sup>3</sup> спор/г	58
ДНК, выделенная из содержимого ран	Мультиплексная ПЦР в реальном времени	A, B, E	10–10 <sup>2</sup> клеток	63
Грубый клеточный лизат, полученный из бульона для обогащения	Мультиплексная ПЦР в реальном времени	A, B, E, F	10 <sup>2</sup> клеток	62
Грубый клеточный лизат, полученный из предварительно обогащенных пищевых продуктов	Мультиплексная ПЦР в реальном времени	A, B, E, F	10 <sup>2</sup> спор/г	55



Таблица 4. Молекулярно-генетические методы, применяемые для генотипирования <i>Clostridium botulinum</i>					
Методы	<i>C. botulinum</i> I–IV группы	Время, необходимое для работы с чистой культурой	Особенности метода	Область применения	Ссылка
Гель-электрофорез в пульсирующем (электрическом) поле (PFGE)	Штаммы	5–7 дней	Рестрикция ДНК кластридиальными эндонуклеазами влияет на выполнении анализа	Эпидемиологические исследования, сравнение штаммов	35, 59
Секвенирование генов рибосомальной РНК	Группы	3–4 дня		Таксономия	33, 49
Риботипирование	Группы	3–5 дней		Филогенетические исследования, идентификация штаммов	60
Полиморфизм длин продуктов амплификации, AFLP	Штаммы и группы	3 дня		Эпидемиологические исследования, сравнение клинических штаммов	60
Метод случайных праймеров, RAPD	Штаммы	1–2 дня	Могут использоваться грубые клеточные лизаты	Быстрое сравнение клинических изолятов	60

могут быть локализованы на хромосоме, на плаزمиде или в составе профага *C. botulinum* [56]. Гены каждого типа токсина высокоспецифичны и представляют собой идеальную генетическую мишень для их обнаружения [57]. Разработаны методы ПЦР для детекции как отдельных типов ботулотоксинов, так и мультиплексные системы для определения одновременно нескольких их типов (табл. 3). В качестве мишени использовали ген *ntnh*, кодирующий синтез гемолизина, поскольку этот ген всегда присутствует в генетическом локусе, кодирующем ботулотоксины [58]. Однако детекция гена токсина не означает, что токсин экспрессируется. Имеются методы ПЦР, позволяющие обнаруживать экспрессию генов *bont*, используя для этого ПЦР с обратной транскриптазой в реальном времени. Этот метод в основном применяют для исследовательских целей, поскольку для получения высококачественной мРНК требуется много времени. Важно заметить, что исследуемые образцы, особенно образцы окружа-

ющей среды, могут содержать ингибиторы ПЦР, поэтому при постановке обычной диагностической ПЦР в ней должны обязательно присутствовать внутренний контроль амплификации и внутренний положительный контроль.

Генотипирование и полногеномное секвенирование *C. botulinum* как инструмент диагностики ботулизма у человека используют для установления эпидемически значимых генетических линий или клонов бактериальных патогенов, циркулирующих в том или ином регионе. Его применяют также для установления источника возбудителя вспышки пищевой инфекции путем сравнения идентичности генотипа штаммов патогена, выделенных от больных, предполагаемых бактерионосителей и непосредственно из продуктов питания, после употребления которых заболели люди. Генотипирование особенно актуально для анализа вспышек ботулизма, поскольку культуры *C. botulinum* отличаются большим фено- и генотипическим разнообразием. Это раз-

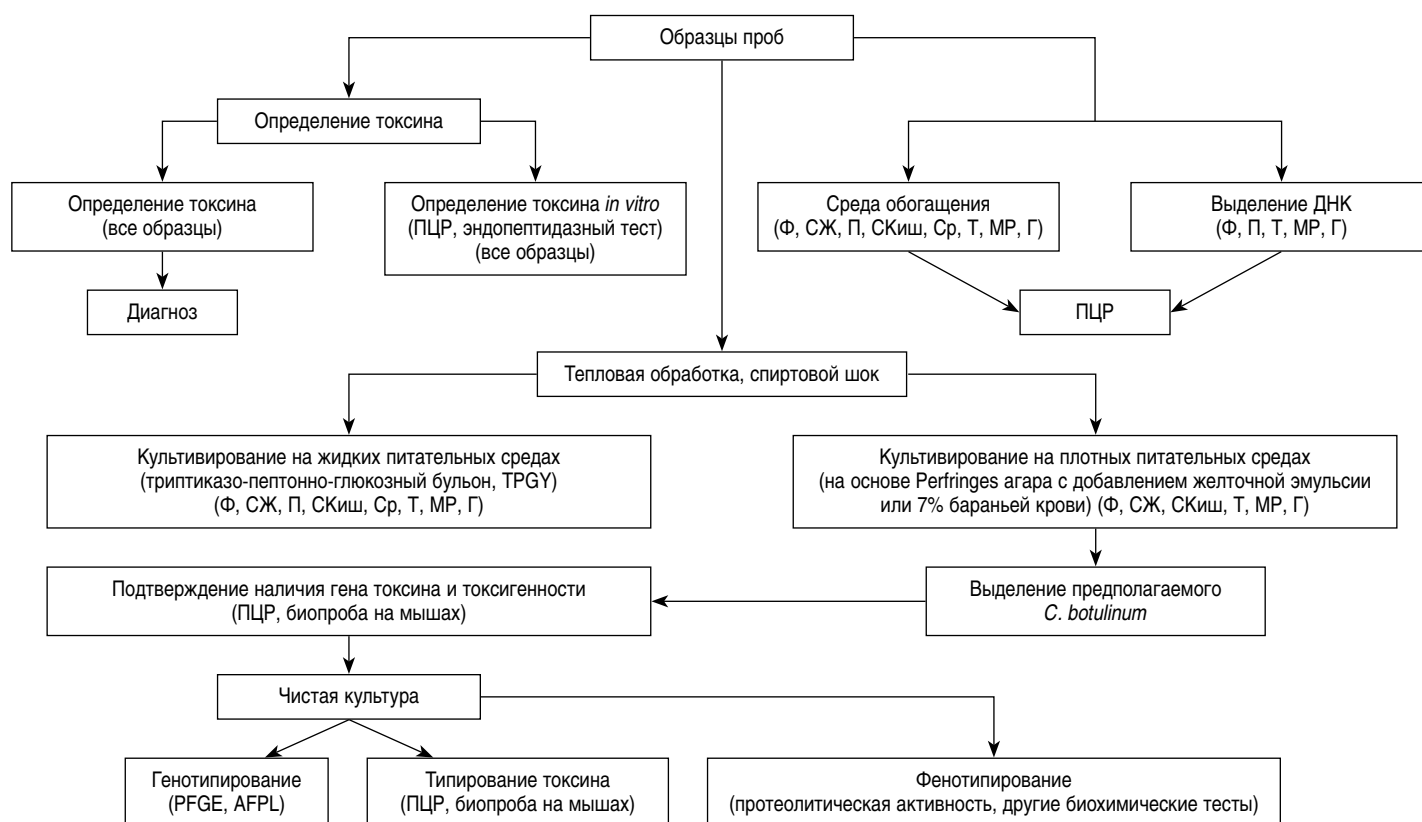


Рис. 5. Схема лабораторной диагностики ботулизма [61, 62].

нообразии обусловлено присутствием в их геномах детерминант разных типов и подтипов нейротоксина, в том числе гибридных, а также присутствием мобильных генетических элементов – плазмид, профагов, IS-элементов и др. [59, 60]. Среди других молекулярно-генетических методов, используемых для типирования *C. botulinum*, следует упомянуть гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE), секвенирование генов рибосомальной РНК, риботипирование, определение полиморфизма длин продуктов амплификации (AFLP), метод случайных праймеров (RAPD) (табл. 4).

Огромное количество информации о *C. botulinum* можно получить при секвенировании нуклеотидных последовательностей всего генома возбудителя. Биоинформационное прочтение нуклеотидной последовательности генома *C. botulinum* позволяет установить генетические особенности штамма, наличие у него плазмид, профагов, детерминант антибиотикорезистентности, определить тип продуцируемого штаммом нейротоксина и т.д. Ожидается, что с расширением возможностей и снижением стоимости полногеномного секвенирования этот метод все больше будет заменять традиционные методы генетического типирования, используемые сейчас для характеристики бактерий. Одновременно полногеномное секвенирование позволяет нам лучше понять природу токсинпродуцирующих клостридий, их генетическое и биологическое разнообразие, генетическую пластичность [61, 62].

Схема диагностики ботулизма включает в себя все описанные выше современные диагностические тесты (рис. 5). Сравнительный анализ методов диагностики ботулизма, применяемых в мировой практике и в Российской Федерации, указывает на отсутствие в нашей стране многих отечественных современных иммунохимических и молекулярно-генетических методов индикации ботулотоксинов в клиническом материале и пищевых продуктах. Разработка отечественных тест-систем для детекции и типирования возбудителя ботулизма может рассматриваться как актуальная задача на современном этапе.

#### Финансирование

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

#### Литература/References

1. Ting PT, Freiman A. The story of *Clostridium botulinum*: from food poisoning to Botox. Clin Med (Lond). 2004 May-Jun;4(3):258-61.
2. Maslanka SE, Luquez C, Dykes JK, Tepp WH, Pier CL, Pellett S, Raphael BH, Kalb SR, Barr JR, Rao A, Johnson EA. A Novel *Botulinum* Neurotoxin, Previously Reported as Serotype H, has a Hybrid-Like Structure with Regions of Similarity to the Structures of Serotypes A and F and Is Neutralized with Serotype A Antitoxin. J Infect Dis. 2016;213(3):379-385. DOI: 10.1093/infdis/jiv327
3. Gonzalez-Escalona N, Thirunavukkarasu N, Singh A, Toro M, Brown EW, Zink D, Rummel A, Sharma SK. Draft Genome Sequence of Bivalent *Clostridium botulinum* Strain IBCA10-7060, Encoding Botulinum Neurotoxin B and a New FA Mosaic Type. Genome Announc. 2014 Dec 11;2(6). pii: e01275-14. DOI: 10.1128/genomeA.01275-14
4. Carter AT, Peck MW. Genomes, neurotoxins and biology of *Clostridium botulinum* Group I and Group II. Res Microbiol. 2015;166:303-317. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.10.010.

5. Benefield DA, Dessain SK, Shine N, Ohi MD, Lacy DB. Molecular assembly of botulinum neurotoxin progenitor complexes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Apr 2;110(14):5630-5. DOI: 10.1073/pnas.1222139110.
6. Lam KH, Yao G, Jin R. Diverse binding modes, same goal: The receptor recognition mechanism of botulinum neurotoxin. Prog Biophys Mol Biol. 2015 Mar;117(2-3):225-231. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2015.02.004.
7. Rossetto O, Pirazzini M, Montecucco C. Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. Nat Rev Microbiol. 2014 Aug;12(8):535-49. DOI: 10.1038/nrmicro3295.
8. Popoff MR, Bouvet P. Genetic characteristics of toxigenic *Clostridia* and toxin gene evolution. Toxicon. 2013 Dec 1;75:63-89. DOI: 10.1016/j.toxicon.2013.05.003
9. Poulain B, Lonchamp E, Jover E, Popoff MR, Molgo J. Mechanisms of action of botulinum toxins and neurotoxins. Ann Dermatol Venereol. 2009 May;136 Suppl 4:S73-6. DOI: 10.1016/S0151-9638(09)74531-4.
10. Arnon SS, Schechter R, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Hauer J, Layton M, Lillibridge S, Osterholm MT, O'Toole T, Parker G, Perl TM, Russell PK, Swerdlow DL, Tonat K. *Botulinum* toxin as a biological weapon: medical and public health management. JAMA. 2001 Feb 28;285(8):1059-70.
11. Auricchio B, Anniballi F, Fiore A, Skiby JE, De Medici D. Evaluation of DNA extraction methods suitable for PCR-based detection and genotyping of *Clostridium botulinum*. Biosecur Bioterror. 2013;11:200-206.
12. Barash JR, Arnon SS. A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins. J Infect Dis. 2014 Jan 15;209(2):183-91. DOI: 10.1093/infdis/jit449
13. Dover N, Barash JR, Hill KK, Xie G, Arnon SS. Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene. J Infect Dis. 2014 Jan 15;209(2):192-202. DOI: 10.1093/infdis/jit450
14. Ekblom R, Wolf JB. A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. Evol Appl. 2014 Nov;7(9):1026-42. DOI: 10.1111/eva.12178.
15. Fillo S, Giordani F, Anselmo A, Fortunato A, Palozzi AM, De Santis R, et al. Draft Genome Sequence of *Clostridium botulinum* B2 450 Strain from Wound Botulism in a Drug User in Italy. Genome Announc. 2015 Apr 2;3(2). pii: e00238-15. DOI: 10.1128/genomeA.00238-15
16. Gismervik K, Bruheim T, Rorvik LM, Haukeland S, Skaar I. Invasive slug populations (*Arion vulgaris*) as potential vectors for *Clostridium botulinum*. Acta Vet Scand. 2014 Oct 3;56(1):65. DOI: 10.1186/s13028-014-0065-z
17. Hill KK, Smith TJ. Genetic diversity within *Clostridium botulinum* serotypes, botulinum neurotoxin gene clusters and toxin subtypes. Curr Top Microbiol Immunol. 2013;364:1-20. DOI: 10.1007/978-3-642-33570-9\_1.
18. Kull S, Schulz KM, Weisemann J, Kirchner S, Schreiber T, Bollenbach A, et al. Isolation and functional characterization of the novel *Clostridium botulinum* neurotoxin A8 subtype. PLoS One. 2015 Feb 6;10(2):e0116381. DOI: 10.1371/journal.pone.0116381
19. Wangroongsarb P, Kohda T, Jittapasartsin C, Suthivarakom K, Kamthalang T, Umeda K, et al. Molecular characterization of *Clostridium botulinum* isolates from foodborne outbreaks in Thailand, 2010. PLoS One. 2014;9(1):e77792.
20. Skarin H, Hafstrom T, Westerberg J, Segerman B. *Clostridium botulinum* group III: a group with dual identity shaped by plasmids, phages and mobile elements. BMC Genomics. 2011 Apr 12;12:185. DOI: 10.1186/1471-2164-12-185
21. Jacobson MJ, Lin G, Raphael B, Andreadis J, Johnson EA. Analysis of neurotoxin cluster genes in *Clostridium botulinum* strains producing botulinum neurotoxin serotype A subtypes. Appl Environ Microbiol. 2008 May;74(9):2778-86. DOI: 10.1128/AEM.02828-07.
22. Sakaguchi Y, Hayashi T, Kurokawa K, Nakayama K, Oshima K, Fujinaga Y, et al. The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Nov 29;102(48):17472-7.

23. Mazuet C, Sautereau J, Legeay C, Bouchier C, Bouvet P, Popoff MR. An atypical outbreak of food-borne botulism due to *Clostridium botulinum* types B and E from ham. *J Clin Microbiol*. 2015 Feb;53(2):722-6. DOI: 10.1128/JCM.02942-14
24. Ronald G, Labbé SG. Guide to Foodborne Pathogens, 2nd Edition. WILEY Blackwell, 2013. 484 p. ISBN: 978-0-470-67142-9.
25. Mazuet C, King LA, Bouvet P, Legeay C, Sautereau J, Popoff MR. Le botulisme humain en France, 2010-2012. *Bull Epidemiol Hebd*. 2014;(5):106-14.
26. Souillard R, Le Marechal C, Hollebecque F, Rouxel S, Barbe A, Houard E, et al. Occurrence of *C. botulinum* in healthy cattle and their environment following poultry botulism outbreaks in mixed farms. *Vet Microbiol*. 2015 Oct 22; 180(1-2):142-5. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.07.032..
27. Roblot P, Roblot F, Fauchere JL. Retrospective study of 108 cases of botulism in Poitiers, France. *J Med Microbiol*. 1994;40:379-384.
28. Kalluri P, Crowe C, Reller M. An outbreak of foodborne botulism associated with food sold at a salvage store in Texas. *Clin Inf Dis*. 2003;37:1490-1495.
29. Sam AH, Beynon HL. Images in clinical medicine: Wound botulism. *N Engl J Med*. 2010 Dec 16;363(25):2444. DOI: 10.1056/NEJMicm1003352
30. Choudhry SA, Anwar MJ, Afzal M, Shah A. Foodborne Botulism, I Only Had Nacho Cheese: A Case Report. *Cureus*. 2017 Sep 8;9(9):e1666. DOI: 10.7759/cureus.1666
31. Arnon SS. Infant botulism – anticipating the 2nd decade. *J Inf Dis*. 1986;154:201-206.
32. Shelley EB, O'Rourke D, Grant K, McArdle E, Capra L, Clarke A, et al. Infant botulism due to *C. butyricum* type E toxin: a novel environmental association with pet terrapins. *Epidemiol Infect*. 2015 Feb;143(3):461-9. DOI: 10.1017/S0950268814002672
33. Nunn F, Cave TA, Knottenbelt C, Poxton IR. Evidence that Key–Gaskell Syndrome is a toxico-infection caused by *Clostridium botulinum* type C/D. *Vet Rec*. 2004; 115:111-115.
34. Cook LV, Lee WH, Lattuada CP, Ransom GM. Methods for the detection of *Clostridium botulinum* toxins in meat and poultry products USDA/FSIS. *Microbiol Lab Guid*. 3rd Ed. Chapter 14. Methods For The Detection Of *Clostridium Botulinum* Toxins In Meat And Poultry Products, In: Microbiology Laboratory Guidebook. United States Department Of Agriculture, Food Safety And Inspection Service Office Of Public Health And Science, Microbiology Division, Washington, DC, 1998.
35. Kolho E, Lindstrom M, Forss N. [Botulism]. *Duodecim*. 2012;128(19):1963-9.
36. Raphael BH, Shirey TB, Luquez C, Maslanka SE. Distinguishing highly-related outbreak-associated *Clostridium botulinum* type A(B) strains. *BMC Microbiol*. 2014 Jul 16;14:192. DOI: 10.1186/1471-2180-14-192
37. MacDonald E, Arnesen TM, Brantsaeter AB, Gerlyng P, Grepp M, Hansen BA, et al. Outbreak of wound botulism in people who inject drugs, Norway, October to November 2013. *Euro Surveill*. 2013 Nov 7;18(45):20630
38. Souillard R, Le Marechal C, Hollebecque F, Rouxel S, Barbe A, Houard E, et al. Occurrence of *C. botulinum* in healthy cattle and their environment following poultry botulism outbreaks in mixed farms. *Vet Microbiol*. 2015 Oct 22; 180(1-2):142-5. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.07.032
39. Chun CL, Ochsner U, Byappanahalli MN, Whitman RL, Tepp WH, Lin GY. Association of toxin-producing *Clostridium botulinum* with the macroalga cladophora in the Great Lakes. *Environ Sci Technol*. 2013 Mar 19;47(6):2587-94. DOI: 10.1021/es304743m..
40. Jang I, Kang MS, Kim HR, Oh JY, Lee JI, Lee HS, Kwon YK. Occurrence of avian botulism in Korea during the period from June to September 2012. *Avian Dis*. 2014 Dec;58(4):666-9. DOI: 10.1637/10793-020414-Case
41. Johnson AL, McAdams-Gallagher SC, Aceto H. Outcome of adult horses with botulism treated at a veterinary hospital: 92 cases (1989-2013). *J Vet Intern Med*. 2015 Jan;29(1):311-9. DOI: 10.1111/jvim.12502.
42. Myllykoski J, Lindstrom M, Bekema E, Polonen I, Korkeala H. Fur animal botulism hazard due to feed. *Res Vet Sci*. 2011 Jun;90(3):412-8. DOI: 10.1016/j.rvsc.2010.06.024.
43. Raymundo DL, Gomes DC, Boabaid FM, Colodel EM, Schmitz M, Correa AMR, Dutra IS, Driemeier D. Type *C. botulism* in swine fed on restaurant waste. *Pesquisa Veter*. Brasil. 2012;32:1145-1147.
44. Elad D, Yas-Natan E, Aroch I, Shamir MH, Kleinbart S, Hadash D, et al. Natural *Clostridium botulinum* type C toxicosis in a group of cats. *J Clin Microbiol*. 2004 Nov;42(11):5406-8. DOI: 10.1128/JCM.42.11.5406-5408.2004
45. Gismervik K, Bruheim T, Rorvik LM, Haukeland S, Skaar I. Invasive slug populations (*Arion vulgaris*) as potential vectors for *Clostridium botulinum*. *Acta Vet Scand*. 2014 Oct 3;56(1):65. DOI: 10.1186/s13028-014-0065-z
46. Torii Y, Goto Y, Takahashi M, Ishida S, Harakawa T, Sakamoto T, et al. Quantitative determination of biological activity of botulinum toxins utilizing compound muscle action potentials (CMAP), and comparison of neuromuscular transmission blockage and muscle flaccidity among toxins. *Toxicon*. 2010 Feb-Mar; 55(2-3):407-14. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.09.005.
47. Pellett S. Progress in cell-based assays for botulinum neurotoxin detection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;364:257-85. DOI: 10.1007/978-3-642-33570-9\_12
48. Stanker LH, Scotcher MC, Cheng L, Ching K, McGarvey J, Hodge D, Hnasko R. A monoclonal antibody-based capture ELISA for botulinum neurotoxin serotype B: toxin detection in food. *Toxins (Basel)*. 2013 Nov 18;5(11):2212-26. DOI: 10.3390/toxins5112212
49. Sharma SK, Ferreira JL, Eblen BS, Whiting RC. Detection of type A, B, E, and F *Clostridium botulinum* neurotoxins in foods by using an amplified enzyme-linked immunosorbent assay with digoxigenin-labeled antibodies. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Feb;72(2):1231-8. DOI: 10.1128/AEM.72.2.1231-1238.2006
50. Zhang Y, Lou J, Jenko KL, Marks JD, Varnum SM. Simultaneous and sensitive detection of six serotypes of botulinum neurotoxin using enzyme-linked immunosorbent assay-based protein antibody microarrays. *Anal Biochem*. 2012 Nov 15;430(2):185-92. DOI: 10.1016/j.ab.2012.08.021
51. Fach P, Perelle S, Dilasser F, Grou, J, Dargaingaratz C, Botella L, et al. Detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay of *Clostridium botulinum* in fish and environmental samples from a coastal area in northern France. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Dec;68(12):5870-6.
52. Fach P, Micheau P, Mazuet C, Perelle S, Popoff M. Development of real-time PCR tests for detecting botulinum neurotoxins A, B, E, F producing *Clostridium botulinum*, *Clostridium baratii* and *Clostridium butyricum*. *J Appl Microbiol*. 2009 Aug;107(2):465-73. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04215.x
53. Garber EA, Venkateswaran KV, O'Brien TW. Simultaneous multiplex detection and confirmation of the proteinaceous toxins abrin, ricin, botulinum toxins, and *Staphylococcus enterotoxins* A, B, and C in food. *J Agric Food Chem*. 2010 Jun 9;58(11):6600-7. DOI: 10.1021/jf100789n
54. Ching KH, Lin A, McGarvey JA, Stanker LH, Hnasko R. Rapid and selective detection of botulinum neurotoxin serotype-A and -B with a single immunochromatographic test strip. *J Immunol Methods*. 2012 Jun 29;380(1-2):23-9. DOI: 10.1016/j.jim.2012.03.008.
55. Tevell Aberg A, Bjornstad K, Hedeland M. Mass spectrometric detection of protein-based toxins. *Biosecur Bioterror*. 2013 Sep;11 Suppl 1:S215-26. DOI: 10.1089/bsp.2012.0072
56. Anniballi F, Fiore A, Lofstrom C, Skarin H, Auricchio B, Woudstra C, et al. Management of animal botulism outbreaks: from clinical suspicion to practical countermeasures to prevent or minimize outbreaks. *Biosecur Bioterror*. 2013 Sep;11 Suppl 1:S191-9. DOI: 10.1089/bsp.2012.0089.
57. Jang I, Lee JI, Kwon YK, Kang MS, Kim HR, Park JY, et al. Single-tube nested PCR assay for the detection of avian botulism in cecal contents of chickens. *Anaerobe*. 2015 Oct;35(Pt B):48-53. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2015.07.001
58. Raphael BH, Andreadis JD. Real-time PCR detection of the nontoxic nonhemagglutinin gene as a rapid screening method for bacterial isolates harboring the botulinum neurotoxin (A-G) gene complex. *J Microbiol Methods*. 2007 Dec; 71(3):343-6. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.09.016
59. Luquez C, Joseph LA, Maslanka SE. Molecular subtyping of *Clostridium botulinum* by pulsed-field gel electrophoresis. *Methods Mol Biol*. 2015;1301:103-13. DOI: 10.1007/978-1-4939-2599-5\_10

60. Hannett GE, Stone WB, Davis SW, Wroblewski D. Biodiversity of *Clostridium botulinum* type E associated with a large outbreak of botulism in wildlife from Lake Erie and Lake Ontario. *Appl Environ Microbiol.* 2011 Feb;77(3):1061-8. DOI: 10.1128/AEM.01578-10
61. Mayo B, Rachid CT, Alegria A, Leite AM, Peixoto RS, Delgado S. Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology. *Curr Genomics.* 2014 Aug;15(4):293-309. DOI: 10.2174/1389202915666140616233211
62. Baym M, Kryazhimskiy S, Lieberman TD, Chung H, Desai MM, Kishony R. Inexpensive multiplexed library preparation for megabase-sized genomes. *PLoS One.* 2015 May 22;10(5):e0128036. DOI: 10.1371/journal.pone.0128036.
63. Smith LDS, Hobbs G. Genus III *Clostridium* Prazmowski. In: BUCHANAN, R. E. & GIBBONS, N. E. (eds.) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th edition ed. Baltimore: William & Wilkins. 1974;1880: 23.
64. Lacy DB, Tepp W, Cohen AC, Dasgupta BR, Stevens RC. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat Struct Biol.* 1998 Oct;5(10):898-902.

#### Информация об авторах:

Ерусланов Борис Васильевич, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболensk, 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 район, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0079

Мицевич Ирина Петровна, старший 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

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

#### Information about authors:

Boris V. Eruslanov, Doctor of Medical Sciences, leading researcher of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology departments, 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, Doctor of Veterinary Sciences, professor, chief researcher of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology departments, 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, senior researcher of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB, 142279, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0079

Ivan A. Dyatlov, Academician of RAS, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB, 142279, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

## Безопасность пищевых продуктов: навозные жуки и почвенные бактерии снижают риск возникновения патогенных микроорганизмов

Известно, что фекалии диких и одомашненных свиней загрязняют продукты на местах, что приводит к болезням пищевого происхождения.

Навозные жуки, вероятно, убивают вредные бактерии, когда они потребляют и закапывают фекалии. Предыдущие исследования также показали, что у этих жуков есть антибиотикоподобные соединения в организме.

Обнаружили, что органическое земледелие способствует увеличению биологического разнообразия среди почвенных бактерий, что снижает выживаемость патогенных микроорганизмов.

Эти результаты показывают, что навозные жуки и почвенные бактерии могут улучшить естественное подавление патогенных микроорганизмов человека на фермах, что дает основания для сокращения использования инсектицидов и стимулирования большего разнообразия растений и насекомых.

Дополнительные лабораторные эксперименты показали, что виды навозных жуков и бактериальные сообщества, типичные для органических ферм, были значительно более эффективными в подавлении патогенных для человека *Escherichia coli* O157: H7 по сравнению с сообществами копрофагов на обычных фермах. Это говорит о том, что практика управления фермой, сохранение копрофагов и подавление патогенных микроорганизмов могут быть связаны.

В целом результаты исследований показывают, что насекомые и микробы могут быстро удалять фекалии, что может снизить устойчивость человеческих патогенов. Рекомендуется учитывать риски и преимущества, связанные с копрофагами, при принятии управленческих решений, касающихся безопасности пищевых продуктов.

Jones M.S., Fu Z., Reganold J.P., et al.  
*Organic farming promotes biotic resistance to foodborne human pathogens.*  
*J Appl Ecol.* 2019;00:1-11.

# Опыт использования технологии мономолекулярного нанопорового секвенирования при изучении штаммов бактерий, депонированных в государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск»

В.И.Соломенцев, А.А.Сизова, Ю.П.Скрябин, А.А.Кисличкина, В.Б.Фролов,  
Н.В.Майская, С.А.Иванов, С.В.Дентовская, А.П.Анисимов, А.Г.Богун

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

Одним из наиболее информативных методов изучения бактерий является полногеномное секвенирование. Мономолекулярное секвенирование является относительно новым и одним из наиболее перспективных способов исследования геномов микроорганизмов. Данная технология позволяет получать прочтения большой длины, что облегчает реконструкцию полных геномов и позволяет изучать любые их особенности.

Принцип работы секвенатора MiniON производства Oxford Nanopore Technologies основан на измерении силы тока, протекающего через нанопору при прохождении через нее молекулы ДНК. Данный секвенатор обладает компактными размерами, стоимость одного раунда секвенирования начинается от 500 долларов США, само оборудование поставляется бесплатно в составе стартового набора. За один раунд секвенирования возможен анализ до 12 бактериальных геномов. Оборудование позволяет проводить прямой анализ РНК без этапа обратной транскрипции. Все это создает большие перспективы для использования секвенатора MiniON в микробиологических лабораториях.

В данной работе мы описываем опыт эксплуатации данного оборудования в отделе коллекционных культур ФБУН ГНЦ ПМБ, а также полученные нами результаты.

*Ключевые слова:* методы, нанопоровое секвенирование

**Для цитирования:** Соломенцев В.И., Сизова А.А., Скрябин Ю.П., Кисличкина А.А., Фролов В.Б., Майская Н.В., Иванов С.А., Дентовская С.В., Анисимов А.П., Богун А.Г. Опыт использования технологии мономолекулярного нанопорового секвенирования при изучении штаммов бактерий, депонированных в государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск». Бактериология. 2018; 3(4): 60–68. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-60-68

## Experience of using the technology of monomolecular nanopore sequence for the study of bacterium strains deponated in the state collection of pathogenic microorganisms and cell cultures “SCPM-Obolensk”

V.I.Solomentsev, A.A.Sizova, Yu.P.Scriabin, A.A.Kislichkina, V.B.Frolov,  
N.V.Mayskaya, S.A.Ivanov, S.V.Dentovskaya, A.P.Anisimov, A.G.Bogun

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

One of the most informative methods of bacterial research is complete genome sequencing. Monomolecular sequencing is a relatively new and most promising way to elucidate the genome of a microorganism. The technology provides genomic reading of the longer length, facilitating the reconstruction of complete genomes to study any of their features. A sequencer MiniON (Oxford Nanopore Technologies) measures current flowing through a nanopore with a DNA molecule passing through it. The sequencer is compact, with the cost of one sequence cycle being \$ 500 minimum. The equipment itself is supplied free of charge as a part of the starter kit. Twelve bacterial genomes are possible to analyze in one sequencing round. The direct

### Для корреспонденции:

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) 36-0000

E-mail: solomentsev@obolensk.org

Статья поступила 07.10.2018 г., принята к печати 25.12.2018 г.

### For correspondence:

Viktor I. Solomentsev, junior research scientist of the collection cultures 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: solomentsev@obolensk.org

The article was received 07.10.2018, accepted for publication 25.12.2018

analysis of the RNA, avoiding the reverse transcription step, is possible. All these make the sequencer MiniON promising for use by microbiological laboratories. The paper deals with the operating experience of the equipment by the Department of collected cultures at the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, as well as with results obtained.

*Keywords: methods, nanopore sequencing*

**For citation:** Solomentsev V.I., Sizova A.A., Scriabin Yu.P., Kislichkina A.A., Frolov V.B., Mayskaya N.V., Ivanov S.A., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P., Bogun A.G.. Experience of using the technology of monomolecular nanopore sequence for the study of bacterium strains deponated in the state collection of pathogenic microorganisms and cell cultures "SCPM-Obolensk". *Bacteriology*. 2018; 3(4): 60–68. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-60-68

**Д**ля исследования геномов микроорганизмов широко используют такие методы, как полимеразная цепная реакция, анализ варибельности числа tandemных повторов, мультилокусное сиквенс-типирование и другие. Наиболее информативным методом изучения геномов бактерий является полногеномное секвенирование. На сегодняшний день широкое распространение получило массивированное параллельное секвенирование (полногеномное секвенирование). Данный подход основан на изучении структуры всего генома микроорганизма. Современные системы позволяют проводить одновременное определение геномов нескольких десятков, а в некоторых случаях сотен бактерий. Существенным недостатком большинства систем для секвенирования является высокая стоимость оборудования, составляющая десятки миллионов рублей.

Существует несколько платформ массивированного параллельного секвенирования. В основе их работы лежат общие принципы – на первом этапе создается библиотека последовательностей ДНК, к которым затем прикрепляются адаптерные последовательности, на втором этапе с помощью ПЦР происходит клональная амплификация каждой молекулы, в результате чего формируются кластеры одинаковых молекул. Полученные кластеры используются как образцы при определении нуклеотидной последовательности с применением оптических или химических методов детекции [1].

Технологии NGS (Next Generation Sequencing) имеют ряд недостатков, к которым относятся малая длина единичных прочтений, ошибки в гомополимерных участках, сложности разрешения числа повторов, зависимость точности прочтения от ГЦ-состава фрагмента ДНК и некоторые другие. В качестве альтернативы все большее распространение получают системы мономолекулярного анализа нуклеиновых кислот, которые часто называют технологиями секвенирования третьего поколения. В настоящее время коммерчески доступными являются системы одномолекулярного секвенирования в реальном времени производства компании PacBio и нанопоровое секвенирование на платформе Oxford Nanopore Technologies (ONT).

Принцип секвенирования PacBio основан на изучении скорости включения в состав синтезируемой молекулы ДНК флуоресцентно меченных нуклеотидов с использованием высокочувствительной оптической системы [2]. Принцип действия секвенаторов ONT основан на измерении электрического тока при прохождении молекулы нуклеиновой кислоты через нанопору. Детекция осуществляется в камере с разделенной мембраной, содержащей нанопору. К камере подается напряжение, вызывающее движение ДНК или РНК через пору. При прохождении молекулы сечение поры уменьшается, в результате чего сила тока снижается. Таким

образом, измеряя силу тока, можно определять тип нуклеотида, проходящего через пору в данный отрезок времени.

Оба подхода позволяют получать единичные прочтения очень большой длины [3]. Длина единичных прочтений на платформе PacBio составляет более 80 тысяч оснований. Для ONT типичная длина единичного прочтения составляет более 10 тысяч оснований. На данный момент удалось экспериментально получить непрерывные прочтения длиной более 1 000 000 оснований. Оборудование ONT значительно дешевле (стоимость секвенатора MiniON с набором реактивов начинается от 1000\$) в сравнении с приборами Sequell (350 000\$) и PacBio RSII (700 000\$) производства Pacific Biosciences. Все приборы генерируют объемы данных, достаточные для анализа нескольких бактериальных геномов. Максимальная производительность MiniON составляет 20 000 000 000 оснований, PromethION – до 6 000 000 000 000 оснований при использовании 48 проточных ячеек. Производительность системы для PacBio Sequell составляет 10 000 000 000 оснований. Системы мономолекулярного нанопорового секвенирования несколько уступают по суммарному времени анализа (более 48 ч для ONT против 4 ч для PacBio). Однако первые данные нанопорового секвенирования становятся доступными уже спустя несколько минут после начала анализа. Системы имеют близкую стоимость проведения одного раунда секвенирования – запуск MiniON оценивается в 475–900 долларов США, для PromethION стоимость составляет 600–2000 долларов. Стоимость секвенирования на системе Sequell составляет 400 долларов США и 850 долларов США за запуск для PacBio RSII. Однако оборудование производства компании Pacific Biosciences в настоящее время недоступно на территории нашей страны.

В 2017 г. в России стало коммерчески доступным оборудование компании Oxford Nanopore Technologies – производителя систем мономолекулярного нанопорового секвенирования. Стоимость стартового набора для проведения исследований, в который входит секвенатор MiniON, а также набор реактивов, на территории Российской Федерации составляет немногим более 100 000 рублей. В связи с этим данное оборудование может быть доступным для оснащения широкого круга микробиологических, в том числе и бактериологических, лабораторий. В данной статье нами описывается опыт эксплуатации оборудования MiniON в отделе коллекционных культур ФБУН ГНЦ ПМБ.

## Материалы и методы

**Оборудование для секвенирования и обработки данных**  
Работа выполнялась на секвенаторе MiniON (Oxford Nanopore Technologies). Для управления секвенатором ис-

пользовали портативный компьютер HP Probook 450 G5, с процессором core i7-8550U и HDD жестким диском объемом 1 Тб. На данную модель ноутбука дополнительно установили 8 Гб оперативной памяти и жесткий диск объемом 1 Тб типа SSD с высокой скоростью записи.

Обработка данных осуществлялась на сервере Z-800 производства Hewlett-Packard с двумя 12-ядерными процессорами Intel® Xeon(R) CPU X5675 @ 3.07GHz, поддерживающими технологию Hyper-threading (всего 24 потока), объемом оперативной памяти 96 Гб типа DDR3.

#### **Программное обеспечение**

При проведении работы мы использовали следующие программы и вычислительные алгоритмы.

Albacore – программа, предназначенная для бейсколлинга, процесса перевода данных из формата fast5 в fastq. Помимо этого, Albacore способна осуществлять разбивку общего массива данных на отдельные образцы.

Для сборки геномов использовали программы Canu, Flye, Unicycler. Подробное описание работы программ приведено в разделе «Результаты и обсуждения».

Для визуализации метрических показателей полученных ридов использовали программу Paurve (<https://github.com/conchoecia/pauvre/blob/master/pauvre/bamparse.py>).

Для определения качества сборок использовали программу Quast (<http://bioinf.spbau.ru/quast>). Визуализацию графов, генерируемых сборщиками, осуществляли с использованием программы Bandage (<https://rrwick.github.io/Bandage/>).

#### **Расходные материалы для секвенирования**

В работе использовали проточные ячейки FLO-MIN106, наборы для приготовления библиотек SQK-LSK108 Ligation Sequencing Kit 1D и Rapid Barcoding Sequencing (SQK-RBK004). При проведении тестового запуска применили контрольные образцы Lambda control DNA.

#### **Бактериальные штаммы**

Штаммы *Yersinia pestis* C-678, *Klebsiella pneumoniae* B-7849 и *Staphylococcus aureus* 2015-C45-1803 были секвенированы с использованием набора SQK-LSK108 для приготовления библиотек посредством фрагментации ДНК и лигирования адаптеров.

Штаммы *Y. pestis* C-771, *Y. pestis* C-776, *Y. pestis* И-1996, *Y. pestis* И-3113, *Y. pestis* C-590, *Y. pestis* C-359, *Y. pestis* C-197, *Y. pestis* C-235 были секвенированы с использованием набора SQK-RBK004 для быстрого приготовления библиотек.

#### **Выделение ДНК**

Для выделения ДНК использовали рутинный метод фенол-хлороформной экстракции. Методические приемы, направленные на получение молекул с высокой молекулярной массой, не применяли. Измерение концентрации ДНК осуществляли на флуориметре Qubit 2.0 с помощью набора реактивов Qubit® dsDNA HS Assay Kit.

#### **Подготовка библиотек для секвенирования**

Приготовление библиотек для секвенирования осуществляли с использованием двух наборов. Набор Ligation Sequencing kit (SQK-LSK108) применяли для приготовления библиотек посредством фрагментации ДНК и лигирования адаптеров. Данный набор входил в стартовый комплект; его применили для секвенирования контрольной фаговой ДНК и штаммов *Y. pestis* C-678, *K. pneumoniae* B-7849 и *S. aureus* 2015-C45-1803.

Набор Rapid Barcoding Kit (SQK-RBK004) закупили дополнительно и использовали для секвенирования штаммов чумного микроба. Данный набор позволяет быстро приготовить набор из нескольких образцов ДНК и секвенировать их на одной проточной ячейке.

#### **Общелабораторное оборудование**

Для работ, помимо наборов для подготовки библиотек и секвенирования, необходимы следующие реактивы и оборудование: пробирки Eppendorf DNA LoBind tubes объемом 1,5 мл, пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл, свободная от нуклеаз вода, свежеприготовленный 70% этанол, водяная баня со льдом, микроцентрифуга, таймер, амплификатор, автоматические регулируемые пипетки с максимальным объемами 2 мкл, 20 мкл, 100 мкл, 200 мкл и 1000 мкл, а также наконечники к ним.

#### **Секвенирование на приборе MinION**

Секвенирование осуществлялось на трех ячейках FLO-MIN106. На первом этапе использовали набор для приготовления библиотек Ligation Sequencing kit (SQK-LSK108). На одной ячейке были проанализированы четыре образца. Секвенирование каждого из образцов осуществлялось в течение 2–4 ч. После секвенирования образцов ячейка промывалась согласно рекомендациям производителя.

Образцы для следующих двух раундов секвенирования были подготовлены с использованием набора Rapid Barcoding Kit (SQK-RBK004). Каждый образец для секвенирования состоял из нескольких библиотек ДНК. Секвенирование каждого образца осуществилось в течение 20–48 ч. Ячейки повторно не использовались.

### **Результаты и обсуждение**

#### **Подготовка оборудования к работе**

Для работы Oxford Nanopore MiniON требуется компьютер с высокими системными требованиями. Необходимы операционная система Windows, MacOS или Ubuntu, процессор серии i7 или Xeon с не менее чем четырьмя ядрами, не менее 16 Гб оперативной памяти, высокоскоростной накопитель типа SSD объемом не менее 1 Тб и с USB-портом версии 3.0. и выше [4].

Поскольку секвенатор MiniON является мобильным устройством, мы решили использовать для работы с ним переносной персональный компьютер (ноутбук), чтобы получить переносной комплект оборудования. На момент поставки секвенатора MiniON в лабораторию (конец 2017 г.) выбор моделей ноутбуков с необходимыми параметрами был ограничен, а стоимость существующих превышала 200 000 рублей. В связи с этим мы выбрали модель, позволяющую установить дополнительные компоненты, – HP Probook 450 G5 с процессором core i7-8550U и установленным жестким диском на 1 терабайт типа HDD и одним модулем оперативной памяти объемом 8 Гб. На данную модель были дополнительно установлены 8 Гб оперативной памяти и накопитель объемом 1 Тб типа SSD. Суммарная стоимость компьютера после установки дополнительных компонентов оказалась существенно ниже стоимости имеющихся в продаже моделей на период покупки оборудования. Внешний вид оборудования представлен на рисунке 1.



Рис. 1. Секвенатор MiniON и компьютер для обработки данных размещены в боксе биологической безопасности.

В процессе секвенирования происходит генерирование данных в специализированном формате fast5. Данный формат отражает особенности прохождения электрического тока через нанопору. Однако данные в этом формате не могут обрабатываться большинством программ для биоинформационного анализа. В связи с этим после анализа необходима конверсия данных в более распространенные форматы, например FASTQ.

Подобный перевод (конверсия) возможен параллельно с генерированием данных или может осуществляться с использованием специализированного вычислительного оборудования (сервер или рабочая станция) после окончания эксперимента.

### Результаты секвенирования образцов, подготовленных с использованием набора SQK-LSK108

Все протоколы для проведения анализа MiniON доступны на сайте сообщества (<https://community.nanoporetech.com>), доступ к которому пользователь получает при приобретении оборудования.

Информация о количестве работающих пор отображается на протяжении всего запуска. С течением времени количество работоспособных пор уменьшается. На рисунке 2 представлены диаграммы состояния проточной ячейки после 4 мин и 20 ч секвенирования соответственно. Интересно отметить, что, несмотря на значительно возросшее количество инактивированных ячеек, количество пор, в которых осуществлялся сиквенс в момент составления диаграммы, через 20 ч секвенирования оказалось большим (182 поры), чем через 4 мин после начала секвенирования (165 пор). Это означает что при оптимальных условиях секвенирование может происходить в течение длительного времени.

Тестовый запуск осуществили в присутствии представителей поставщика оборудования с использованием ДНК фага λ и соответствующего протокола для проверки оборудования. На рисунке 3 представлен отчет по количеству и длине полученных ридов. В таблице 1 представлены метрические показатели запуска, на рисунке 3 – распределение индивидуальных прочтений.

Размер генома фага λ составляет приблизительно 45 000 оснований. Однако при секвенировании нами были обнаружены прочтения длиной более 50 000 оснований. В результате анализа установлено, что данное прочтение состоит из нескольких последовательностей, гомологичных разным участкам генома фага λ. Вероятно, подобные артефакты связаны с лигированием нескольких молекул ДНК в процессе приготовления образца для секвенирования.

После завершения тестового эксперимента проточная ячейка был залита буфером для промывки и оставлена на ночь. На следующий день был проанализирован штамм

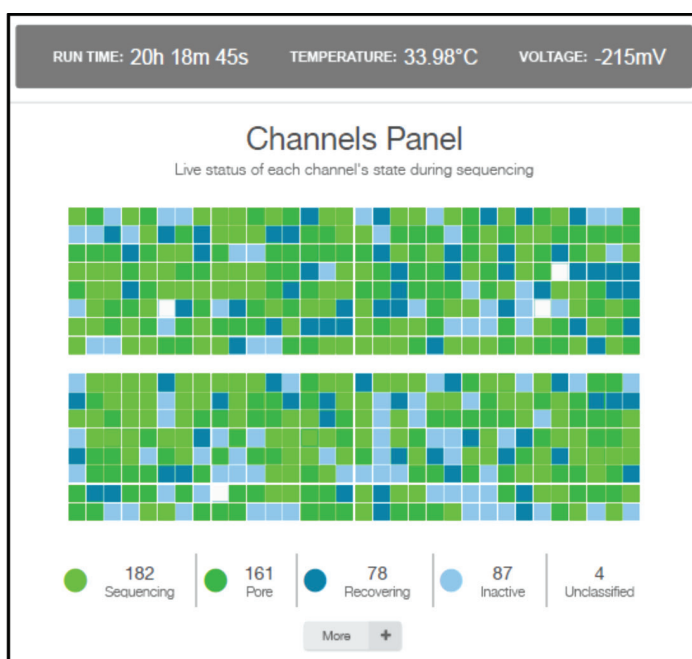
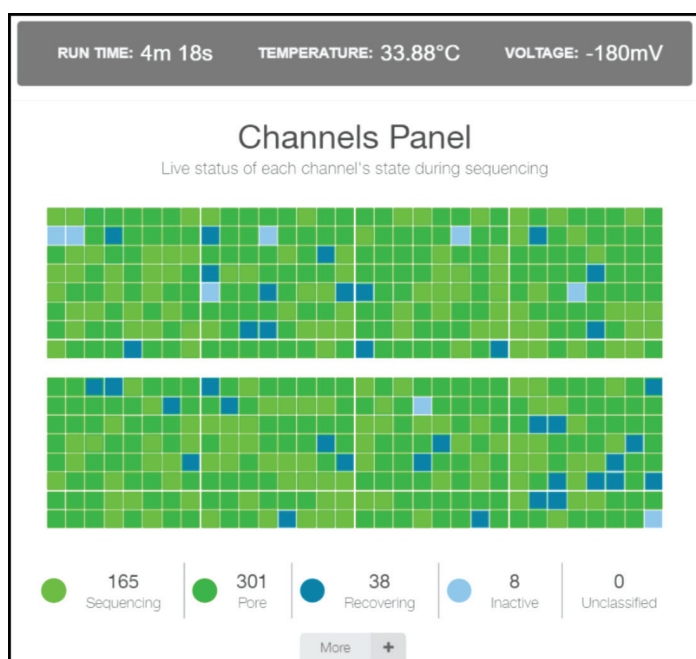


Рис. 2. Диаграмма состояния пор в проточной ячейке через 4 мин и 20 ч после начала секвенирования.



*Y. pestis* C-678. Метрические показатели архива ридов представлены в таблице 2. Распределение по количеству и качеству – на рисунке 4. Стоит отметить снижение качества (показатель Phred Quality – Q) полученных ридов при повторном и последующих запусках на одной ячейке. Данный пока-

затель рассчитывается по формуле  $Q = -10 \log_{10}P$ , где P – вероятность ошибки. Таким образом, при Q = 10 и Q = 20 вероятность ошибочного определения нуклеотида равняется 10% и 1% соответственно. Несмотря на то что средняя длина ридов при повторном использовании проточной ячей-

Таблица 1. Параметры ридов с тесового запуска (ДНК фага λ)

Образец	Риды	Нуклеотиды	Длина			
			Медианная	Сред.	Мин.	Макс.
ДНК фага λ	10 290	70 941 099	6 894.18	6 574	292	51 082

Таблица 2. Параметры ридов при анализе ДНК штамма *Y. pestis* C-678

Штамм	Риды	Нуклеотиды	Длина			
			Медианная	Сред.	Мин.	Макс.
<i>Y. pestis</i> C-678	6527	18 553 788	2842.62	1549	77	58628

Таблица 3. Параметры ридов при анализе ДНК *K. pneumoniae* B-7849

Штамм	Риды	Нуклеотиды	Длина			
			Медианная	Сред.	Мин.	Макс.
<i>K. pneumoniae</i> B-7849	10 664	44 598 141	4 182.12	1 731	5	95 471

Таблица 4. Параметры ридов при анализе ДНК *S. aureus* 2015-C45-1803

Штамм	Риды	Нуклеотиды	Длина			
			Медианная	Сред.	Мин.	Макс.
<i>S. aureus</i> 2015-C45-1803	438	1 146 012	2 616.47	912	5	24 363

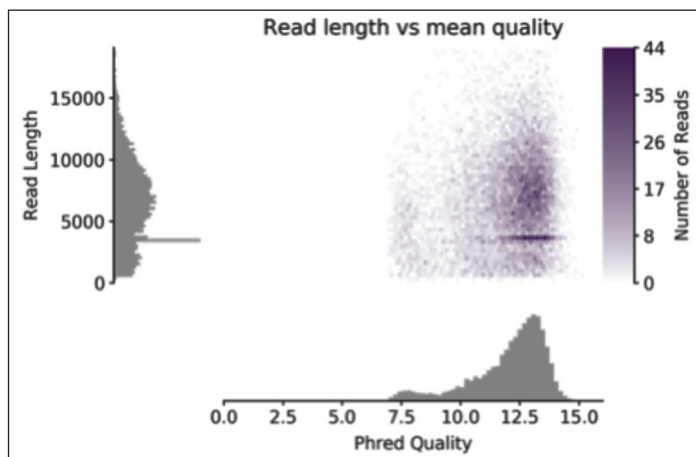


Рис. 3. Распределение ридов при анализе штаммов в пробном запуске с λ фагом.

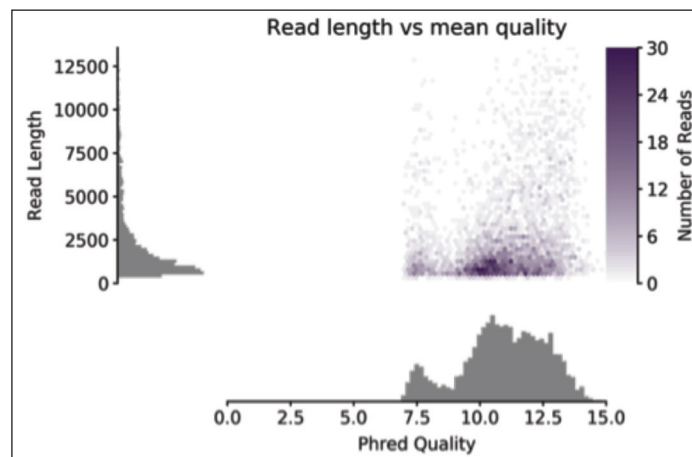


Рис. 4. Распределение ридов при анализе *Y. pestis* C-678.

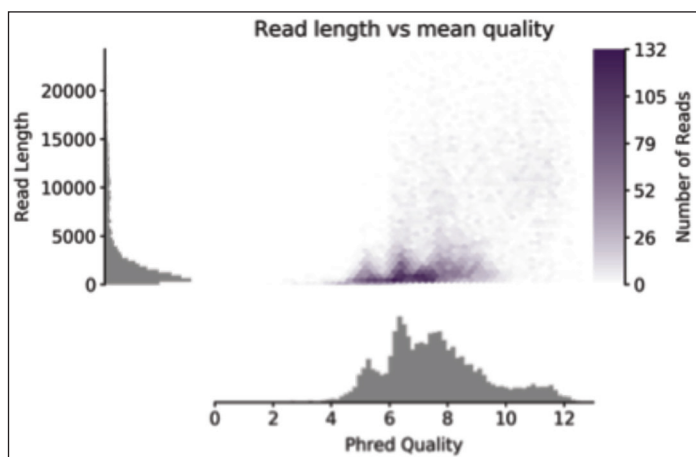


Рис. 5. Распределение ридов при анализе *K. pneumoniae* B-7849.

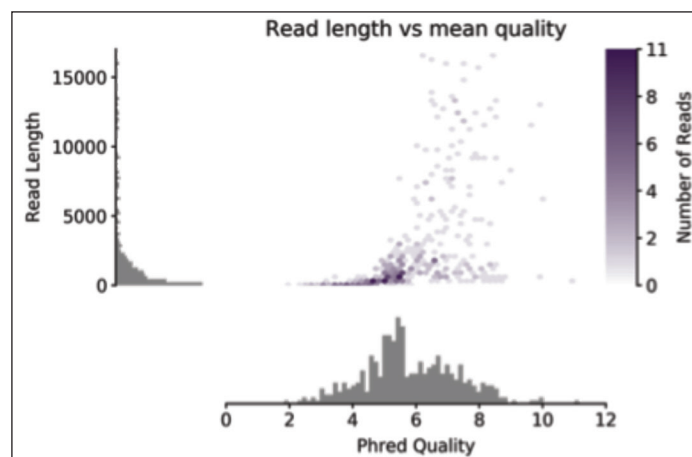


Рис. 6. Распределение ридов при анализе *S. aureus* 2015-C45-1803.

Таблица 5. Анализ геномов штаммов чумного микроба при использовании второй ячейки (протокол SQK-RBK004)

Штамм	Риды	Нуклеотиды	Длина			
			Медианная	Сред.	Мин.	Макс.
<i>Y. pestis</i> C-197	168 733	1 452 447 205	8607,96	4 456	139	145 806
<i>Y. pestis</i> C-235	120 024	1 098 703 801	9154,03	5 331	103	123 411
<i>Y. pestis</i> C-359	107 655	697 016 934	6474,54	3 736	143	100 826
<i>Y. pestis</i> C-739	15 863	78 777 467	4966,11	2 305	137	98 721

Таблица 6. Анализ геномов штаммов чумного микроба при использовании третьей ячейки (протокол SQK-RBK004)

Штамм	Риды	Нуклеотиды	Длина			
			Медианная	Сред.	Мин.	Макс.
<i>Y. pestis</i> C-771	95 035	424 022 177	4 461	2 635	82	87 573
<i>Y. pestis</i> C-776	78 546	374 444 809	4 767	2 563	89	109 376
<i>Y. pestis</i> И-1996	8 975	100 363 313	11 182	5 886	94	132 863
<i>Y. pestis</i> И-3113	53 647	617 169 107	11 504	7 107	150	163 412

Таблица 7. Показатели N25, N50, N75 для данных, полученных на второй ячейке MinION (протокол SQK-RBK004)

Штамм	N25	N 50	N75	Количество ридов		
				N25	N50	N75
<i>Y. pestis</i> C-197	32 284	17 577	8422	8742	26 209	59 899
<i>Y. pestis</i> C-235	30 045	16 951	8699	7214	21 175	46 542
<i>Y. pestis</i> C-359	21 332	11 945	6019	6244	18 727	41 831
<i>Y. pestis</i> C-739	22 398	10 977	4577	643	2068	5159

Таблица 8. Показатели N25, N50, N75 для данных, полученных на третьей ячейке MinION (протокол SQK-RBK004)

Штамм	N25	N 50	N75	Количество ридов		
				N25	N50	N75
<i>Y. pestis</i> C-771	14 676	7641	3962	4651	15 049	34 528
<i>Y. pestis</i> C-776	17 467	8973	4177	3543	11 183	26 530
<i>Y. pestis</i> И-1996	44 759	22 906	10 352	404	1192	2798
<i>Y. pestis</i> И-3113	33 381	21 299	10 728	3165	8794	18 959

ки оказалась значительно меньше (1546 оснований против 6574), максимальная длина оказалась существенно выше (58 628 против 11 236 оснований).

После завершения эксперимента по секвенированию образца ДНК *Y. pestis* C-678 ячейка также была промыта буфером.

Следующий раунд секвенирования проведен с ДНК штамма *K. pneumoniae* В-7849. Качество полученных данных оказалось значительно ниже, чем в предыдущих запусках (табл. 3). Распределение по количеству и качеству показано на рисунке 5. Однако в данном случае удалось сгенерировать больше информации, чем в случае анализа генома чумного микроба.

Последний запуск на данной ячейке был проведен с ДНК штамма *S. aureus* 2015-C45-1803. Метрические показатели ридов представлены в таблице 4. Распределение по количеству и качеству – на рисунке 6.

В связи с тем что эффективность анализа образцов после промывки проточной ячейки существенно снижалась, нами было принято решение использовать наборы реактивов, позволяющие анализировать одновременно несколько образцов ДНК. Мы выбрали набор SQK-RBK004, позволяющий осуществлять быструю пробоподготовку и мультиплексирование до 12 образцов. Было проведено два раунда секвенирования с использованием двух проточных ячеек. В таблицах 5 и 6 представлены результаты анализа геномов штаммов чумного микроба, полученные на второй и третьей ячейке соответственно.

Одним из распространенных метрических показателей, используемых для оценки полученных данных при полноге-

номном секвенировании, является N50 – длина последовательности, которая вместе со всеми последовательностями большей длины составляет более 50% от суммарной длины всех последовательностей, полученных в эксперименте. N25 и N75 определяют минимальную длину для 25% и 75% наиболее длинных последовательностей соответственно. Обычно данный показатель используется для последовательностей, полученных при реконструкции геномов. Однако мы провели анализ архивов сырых ридов, полученных в наших экспериментах. В таблицах 7 и 8 представлены значения для штаммов *Y. pestis* первого и второго запуска по протоколу SQK-RBK004.

Длина ридов и их количество являются важными предпосылками для эффективного анализа генома микроорганизма. Наличие незначительного числа ридов большой длины в случае нанопорового мономолекулярного секвенирования может оказаться более важным, чем присутствие большого количества коротких ридов в архиве. Например, N50, равный 17 577 оснований, полученный при анализе штамма *Y. pestis* C-197, означает, что более половины из 1 452 447 205 оснований, полученных при секвенировании, приходится на риды длиной 17 577 оснований и более. В то же время средняя и медианная длина ридов для данного архива составляет 4456 и 8607 оснований соответственно. Средние значения отражают эффективность работы нанопор в процессе секвенирования, однако малоинформативны для изучения биологически значимых признаков. На рисунке 7 представлено распределение прочтений в зависимости от их характеристик для ДНК четырех штаммов чумного микроба.

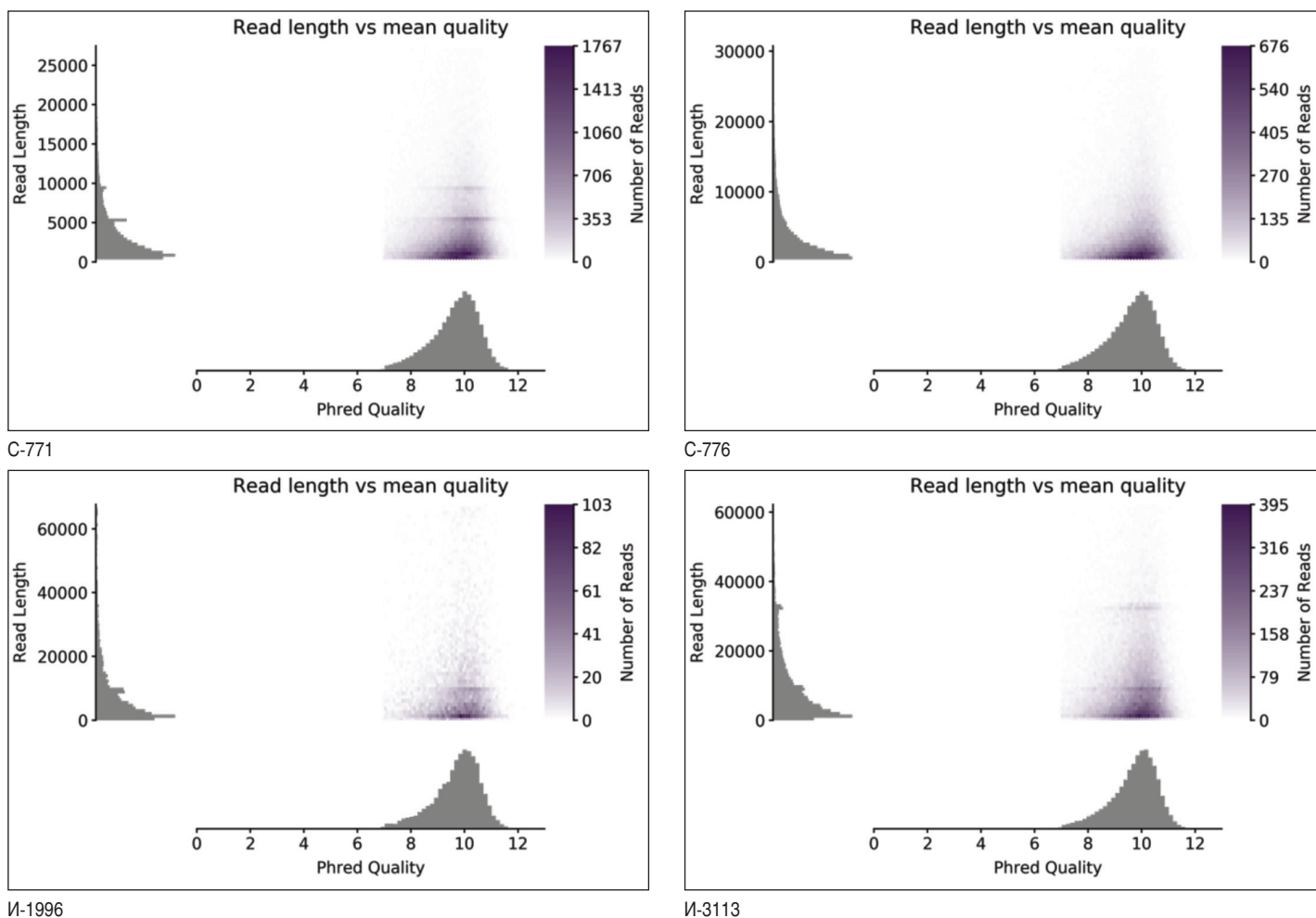


Рис. 7. Распределение ридов при анализе штаммов C-771, C-776, И-1996, И-3113.

Биоинформационный анализ полученных данных секвенирования MiniON несколько отличается от анализа данных массивированного параллельного секвенирования. На первом этапе файлы с данными в формате .fast5 с помощью программы Albacore разбивают на отдельные образцы. Поскольку большинство программ для биоинформационного анализа работают с данными в формате .fast5, необходимо осуществлять их конверсию.

Длинные риды, получаемые в результате мономолекулярного нанопорового секвенирования, облегчают сборку бактериальных геномов. Мы провели сравнение результатов, получаемых при использовании программ Canu, Unicycler и Flye для данных, полученных при использовании набора SQK-RBK004 для быстрого приготовления библиотек. Все программы находятся в свободном доступе и доступны для скачивания на веб-сайте <https://github.com>. Результаты представлены на рисунке 8.

В случае реконструкции кольцевой последовательности бактериальной хромосомы программа Bandage визуализирует полученные данные как кольцевую линию. Если реконструировать кольцевую последовательность не удастся, программа визуализирует полученные последовательности как фрагменты, длина которых изображается пропорционально их размерам.

Нам удалось реконструировать полные кольцевые последовательности бактериальной хромосомы для всех восьми

штаммов *Y. pestis* (рис. 8). Наибольшую эффективность продемонстрировала программа Flye. Однако при анализе штамма *Y. pestis* И-1996 последовательность хромосомы чумного микроба была реконструирована с использованием программы Unicycler, тогда как программа Flye не позволила сделать это.

Следует отметить, что в силу того, что данные мономолекулярного нанопорового секвенирования могут содержать большое количество ошибок, результаты реконструкции бактериальных хромосом нельзя рассматривать как завершённые геномы. Для увеличения точности необходимо использовать дополнительные методы, такие как гибридный анализ с использованием данных массивированного параллельного секвенирования.

### Выводы

Установлено, что одновременный анализ нескольких образцов на одной ячейке является более предпочтительным, чем последовательный анализ образцов на одной ячейке после промывки. Мы смогли получить в результате секвенирования архив ридов, содержащий информацию о 3 326 945 407 нуклеотидах, чем экспериментально подтвердили возможность получения больших объемов данных на оборудовании MiniON. Подобный массив позволяет получить стократное покрытие для десяти бактериальных гено-

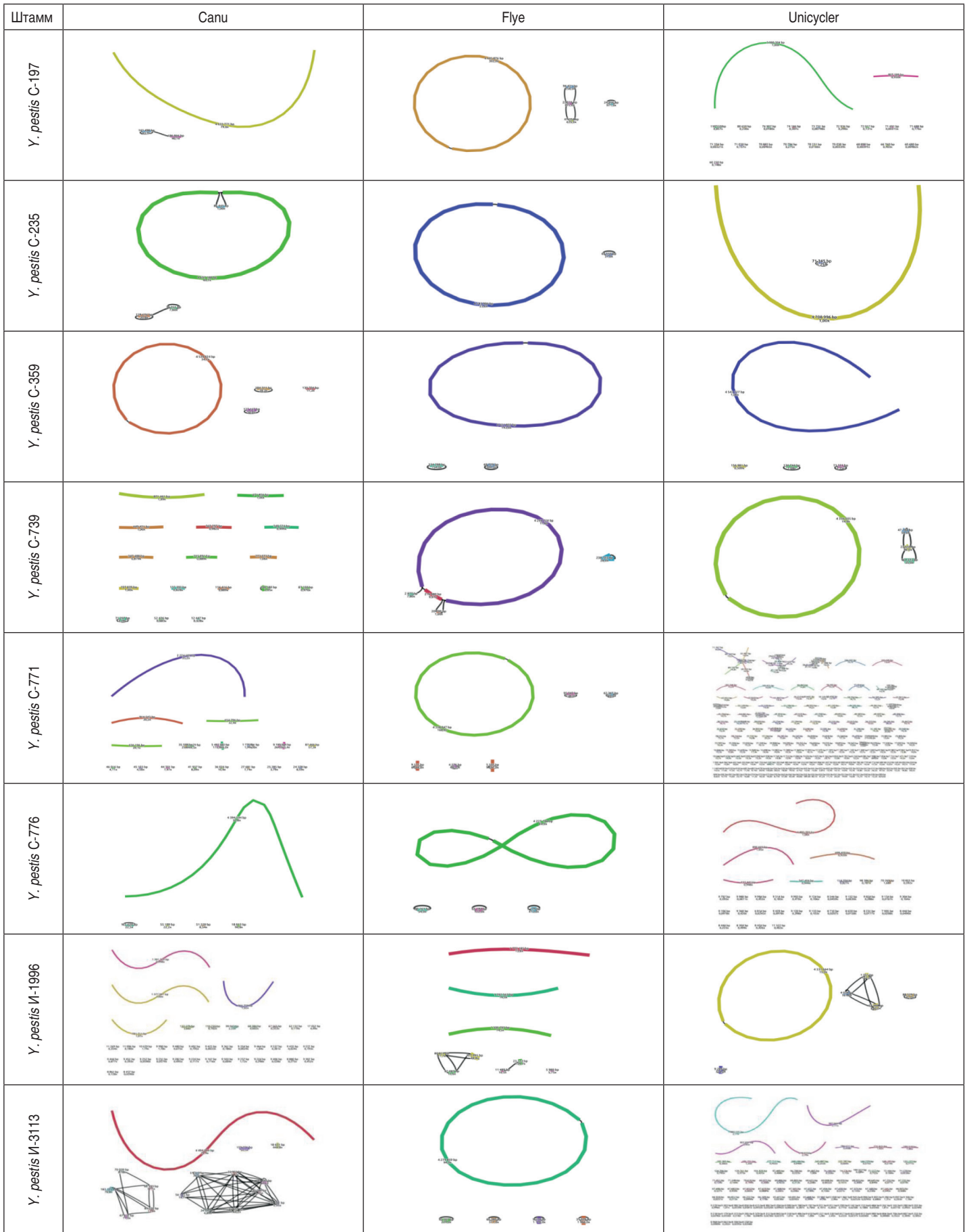


Рис. 8. Результаты реконструкции бактериальных хромосом и плазмид на основании данных мономолекулярного секвенирования.

мов среднего размера. Максимальная длина единичного прочтения составила 163 412 основания.

По нашему мнению, оборудование Oxford Nanopore MiniON в перспективе можно широко использовать в микробиологических лабораториях. Опыт использования MiniON при исследовании вирусов Зика и Эбола показывает высокую его эффективность при работе в экстремальных и полевых условиях [5, 6]. Простота экспериментальных процедур позволяет проводить секвенирование в различных условиях специалистами с минимальной подготовкой. Благодаря низкой цене, возможно комплектование данным оборудованием лабораторий любого уровня. Однако биоинформационный анализ и интерпретация данных являются сложным процессом, требующим мощного вычислительного оборудования и квалифицированного персонала.

### Финансирование

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 14-15-00599).*

### Литература/References

1. Metzker ML. Sequencing technologies – the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010 Jan;11(1):31-46. DOI: 10.1038/nrg2626. Epub 2009 Dec 8.
2. Rhoads A, Au KF. PacBio sequencing and its applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2015 Oct;13(5):278-89. DOI: 10.1016/j.gpb.2015.08.002.
3. van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Naquin D, Thermes C. The third revolution in sequencing technology. *Trends Genet.* 2018 Sep;34(9):666-681. DOI: 10.1016/j.tig.2018.05.008.
4. Wang JR, Jones CD. Fast alignment filtering of nanopore sequencing reads using locality-sensitive hashing. 2015 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM). – IEEE, 2015, pp. 127-130.
5. Hoenen T, Groseth A, Rosenke K, Fischer RJ, Hoenen A, Judson SD, et al. Nanopore sequencing as a rapidly deployable Ebola outbreak tool. *Emerg Infect Dis.* 2016 Feb; 22(2):331-4. DOI: 10.3201/eid2202.151796.
6. Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, Claro IM, Smith AD, Gangavarapu K, et al. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat Protoc.* 2017 Jun;12(6):1261-1276. DOI: 10.1038/nprot.2017.066

### Информация об авторах:

Сизова Анжелика Алексеевна, 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

Скрябин Юрий Павлович, научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов 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

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

Фролов Вадим Борисович, инженер 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

Майская Надежда Васильевна, 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

Иванов Сергей Андреевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы 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

Дентовская Светлана Владимировна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лабораторией микробиологии чумы 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

Анисимов Андрей Павлович, доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе 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

Богун Александр Геннадьевич, кандидат биологических наук, ведущий 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) 360000

### Information about authors:

Anzhelika A. Sizova, technician-programmer of the collection cultures Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0000

Yuriy P. Skryabin, research scientist of laboratory of antimicrobial agents, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0000

Angelina A. Kislichkina, PhD (Biology), senior reseacher of the collection cultures department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 360000

Vadim B. Frolov, engineer of collection cultures department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0000

Nadezhda V. Mayskaya, research scientist of the collection cultures department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0000

Sergey A. Ivanov, PhD (Biology), leading researcher of the laboratory of microbiology of the plague, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0000

Svetlana V. Dentovskaya, MD, PhD, DSc, chief research scientist of laboratory of microbiology of plague, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0000

Andrey P. Anisimov, MD, PhD, DSc, Deputy Director for scientific work, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0000

Aleksander G. Bogun, PhD (Biology), leading researcher of the collection cultures department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0000

## Международная конференция по предотвращению и контролю над заболеваемостью чумой (12–16 ноября 2018 г., г. Харбин, КНР)

**В** рамках инициативы Китайской Народной Республики по совместному строительству «одного пояса и одного пути», направленному на формирование новой модели международного сотрудничества и развития с помощью укрепления действующих региональных двусторонних и многосторонних механизмов и структур взаимодействий с участием Китая, Национальный институт контроля и профилактики инфекционных заболеваний КНР и Провинциальный центр по контролю и профилактике заболеваний провинции Хэйлунцзян организовали в ноябре 2018 г. в г. Харбине Международную конференцию по совместным действиям по профилактике чумы и борьбе с ней. Сопредседатели конференции – академики Китайской Академии Наук: Фу Гао (генеральный директор Китайского CDC) и Джянго Ксу (директор Государственной ключевой лаборатории предотвращения и контроля инфекционных заболеваний Китайского CDC). Председатель национального оргкомитета конференции – профессор Ли Вэй (директор лаборатории микробиологии чумы и сибирской язвы Китайского CDC). Спонсоры конференции: Китайский центр по контролю и профилактике заболеваний, Государственная ключевая лаборатория по профилактике и контролю инфекционных заболеваний, Институт им. Ву Лиен Те, Харбинский медицинский университет. В состав международного научного комитета конференции вошло 14 ученых: представители Китая – Фу Гао, Джянго Ксу, Ли Вэй и Руйфу Ян (директор Государственной ключевой лаборатории патогенов и биобезопасности института микробиологии и эпидемиологии, Пекин); России – Андрей Анисимов (ГНЦ ПМБ, Оболенск), Сергей Балахонов (Иркутский НИПЧИ СДВ, Иркутск) и

Галина Ерошенко (РосНИПЧИ «Микроб», Саратов); по одному представителю Франции – Джавиер Пизарро-Церда (Институт Пастера, Париж); Бразилии – Алзира Алмейда (Национальная чумная референс-служба, Рецифе); Финляндии – Микаэл Скурник (Хельсинкский университет); Монголии – Цобадрак Ниямдордж (Национальный центр зоонозных болезней); Таджикистана – Рамазон Гурезович Муродов (Республиканский центр борьбы с карантинными болезнями); США – Пол Мид (CDC) и Южной Африки – Люсиль Блюмберг (Национальный институт инфекционных болезней, Сандрингем).

В конференции приняли участие 93 специалиста (69 из них – представители Китая) – микробиологи, эпидемиологи, иммунологи, инфекционисты из 17 стран мира.

Научная программа конференции включала следующие основные направления в тематике докладов и презентаций:

1. риск распространения чумы в контексте глобализации (мониторинг чумы и борьба с эпидемией в разных странах);
2. молекулярное типирование и технология геномного отслеживания: применение в исследовании вспышки чумы;
3. патогенез чумы, адаптация и эволюция хозяев, переносчиков, экологические аспекты.
4. Стратегии и меры по борьбе с чумой у животных и людей, включая оценки риска международного распространения чумы. История заболевания чумой людей в Китае. По данному разделу было также проведено **Интерактивное обсуждение: Стратегии и меры; Инициатива и реализация.**

На двух вступительных пленарных лекциях были представлены следующие доклады: **1. Plague Research & Public**





**Health Activities at the Institut Pasteur (Paris, France), докладчик – проф. Javier Pizarro-Cerda (Yersinia WHO Research & Reference Centre),**

доложена краткая справка об истории и достижениях Института Пастера и его филиалов в изучении микробиологии и эпидемиологии чумы, а также представлена информация о современной ситуации по чуме в мире и в наиболее активных природных очагах этой инфекции, в частности, подробно доложена динамика развития эпидемиологической ситуации по чуме на о. Мадагаскаре, особенностях изолируемых здесь штаммов возбудителя, клинических формах чумы. Большой интерес вызвали также представленные проф. Джавиер Пизарро-Церда разработки вакцины против чумы на основе рекомбинантных штаммов псевдотуберкулезного микроба с клонированным фрагментом оперона, кодирующего синтез капсульного антигена F1 *Yersinia pestis*. Полученная французскими исследователями живая аттенуированная вакцина на основе *Y. pseudotuberculosis*, продуцирующего F1 антиген, в одной оральной дозе успешно обеспечивала защиту мышей от легочной и подкожной формы заражения возбудителем чумы.

**2. Source tracing of *Yersinia pestis* based on genomic analysis докладчик проф. Ruifu Yang (Institute of Microbiology & Epidemiology, Beijing, China),** в лекции были представлены материалы изучения филогенеза *Y. pestis* и глобального распространения по континентам в течение трех пандемий сформировавшихся в процессе эволюции отдельных инфравидовых ветвей возбудителя чумы. Продемонстрированы возможности современных методов клональной идентификации особо опасных патогенов и их использование в молекулярной эпидемиологии. Реконструированы на основе полногеномного сиквенса, SNP-типирования, других современных методов углубленного генетического анализа основные направления эволюции чумного микроба. Также с генетических позиций представлены данные об изучении избирательной вирулентности «полевых» штаммов чумного и отсутствии признаков их патогенности для человека.

Доклады, представленные в ходе 4 вышеупомянутых заседаний специалистами из разных стран (США, Бразилии, России, ЮАР, Монголии, Ирана, Китая, Республики Мадагаскар, Финляндии, Таджикистана и др.), отражали текущую ситуацию по организации системы профилактических и контрольных мероприятий по чуме на местах и уроки, извлеченные из многолетней практики борьбы с чумой в разных

странах. Представленная информация, безусловно, полезна в плане обмена опытом и накопленными знаниями для совершенствования контроля над чумой на фоне общемировых процессов по глобализации. В заключение конференции состоялись обсуждение докладов и интерактивная дискуссия по эффективности используемых в различных странах подходов по контролю и профилактике чумы в природных очагах. В частности, обсуждались комплексы мероприятий, направленных на активное риск-ориентированное воздействие на эпизоотический процесс методами неспецифической профилактики и снижение, таким образом, угрозы заражения людей и перехода инфекционного процесса в фазу антропонозного распространения. Большинство участников конференции поддержали озвученную С.Балахоновым в ходе дискуссии активную концепцию минимизации рисков, так или иначе возникающих при активизации природных очагов чумы. Меньше сторонников было по пассивному мониторингу эпизоотий, не предусматривающему проведение активных мероприятий неспецифической профилактики чумы до выявления случаев заболевания людей. Данный подход был озвучен на основе опыта экспертов из США.

На выставке научно-исследовательского и лабораторно-диагностического оборудования, организованной фирмами-изготовителями из КНР, наибольший интерес представляли новые образцы специализированного диагностического оборудования компактного формата для «полевой работы» в условиях максимального приближения к очагу инфекции. В частности, амплификатор Pockit Micro Nucleic Acid Analyzer на 1–4 микропробирки для постановки изотермического варианта ПЦР фактически карманного размера (вес прибора 380 г). Прибор позволяет по заявленным характеристикам осуществлять в течение 45 мин индикацию ДНК возбудителя чумы и других опасных патогенов с чувствительностью от 10 копий ДНК-мишени в пробе, т.е. не уступает современным стационарным амплификаторам, работающим в режиме “real time PCR”. Предлагается также вариант прибора Pockit Micro Combo в комплекте с автоматической станцией для экстракции нуклеиновых кислот, автоматическими пипетками и другими необходимыми для анализа расходными материалами в специальном кейсе размером 62,9 × 49,7 × 35,3 см и весом примерно 6,5 кг. Портативность комплекта открывает возможности использования его для целей эпидемиологической разведки, экстренных выездов для расшифровки или уточнения диагноза в составе мобильной группы экспертов.

Интерес также вызывают малогабаритные диагностические комплекты (ридеры) для стандартизованного учета результатов иммунохроматографических тестов, непосредственно у постели больного или в полевых условиях с оцифровкой данных реакции; наборы для серологических реакций, пробоподготовки и ПЦР-анализа на опасные инфекционные болезни.

*С.В.Балахонов, доктор медицинских наук, профессор, директор ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Иркутск, Российская Федерация*

# Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур

## Список услуг, предоставляемых ГКПМ-Оболенск

### ГКПМ-Оболенск



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

#### Коллекция оказывает услуги:

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

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

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

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

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

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

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



Уважаемые коллеги!

**ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора**

приглашает Вас пройти обучение на курсах повышения квалификации

Обучение предусматривает:

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

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

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

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

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

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

#### Контактная информация:

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

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

E-mail: [kuzin@obolensk.org](mailto:kuzin@obolensk.org)

Подробная информация

[www.obolensk.org](http://www.obolensk.org) Дополнительное профессиональное образование





# Правила оформления статей (основные положения)

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

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

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

К публикации прилагается экспертное заключение организации об отсутствии ограничений для открытой публикации представленных материалов.

Материалы для публикации, включая сопровождающие документы, направляются в редакцию в электронной форме по адресу: [info@obolensk.org](mailto:info@obolensk.org) или [bacteriology@obolensk.org](mailto:bacteriology@obolensk.org). В теме сообщения следует указать «Бактериология».

## Требования к оформлению статьи.

*Экспериментальная статья* должна состоять из разделов: введение, материалы и методы, результаты и обсуждение, список литературы.

Рукопись должна быть подготовлена в текстовом редакторе MS Word, шрифт – Times New Roman, размер – 14, межстрочный интервал – 1,5, поля – 2 см. Статья должна включать резюме и ключевые слова на русском и английском языках. Нумерация всех страниц рукописи сквозная.

*Краткие сообщения* представляются без таблиц и рисунков.

Статья должна быть подписана всеми авторами, включая иностранных.

К статье следует приложить сведения об авторах на русском и английском языках с указанием адреса, контактных телефонов (служебного и мобильного), факса и электронной почты с указанием автора, ответственного за переписку с редакцией.

Заглавие статьи оформляется следующим образом:

### НАЗВАНИЕ СТАТЬИ

И. И. Иванов\*, П. П. Петров\*\*

\*Первая организация, г. Москва, РФ

\*\*Вторая организация, Техас, США

E-mail

[далее текст аннотации и ключевые слова]

Текст статьи, включая резюме, список литературы, подписи к рисункам и таблицы, должны быть оформлены одним файлом, а каждый рисунок – отдельным файлом.

РЕЗЮМЕ статьи должно быть представлено на русском и английском языках, отражать основные полученные результаты и содержать не более 250 слов.

КЛЮЧЕВЫХ СЛОВ (словосочетаний) должно быть не более 10, на русском и английском языках.

Во ВВЕДЕНИИ (без заголовка) следует изложить мотивацию написания данной работы и отдельным абзацем обозначить цель исследования. Дополнительно на английском языке.

Раздел МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ должен содержать сведения об объекте исследования (включая источник получения, название коллекции) и краткое описание использованных методик, позволяющее их воспроизвести (на ранее опубликованные и общеизвестные методы дается ссылка); для приборов и реактивов указываются название фирмы на языке оригинала в кавычках и страны в скобках.

Следует использовать общепринятые современные сокращения мер, физических, химических и математических величин, терминов и т.д. Единицы измерения должны даваться в единицах СИ (Система Интернациональная). Обозначения мутантных и рекомбинантных форм микроорганизмов следует приводить в соответствии с международными правилами. Для трехбуквенного обозначения генов бактерий используются строчные буквы (курсив).

Рисунки и таблицы размещаются в тексте статьи в соответствии с пожеланиями авторов. Кроме того, черно-белые и цветные рисунки (в формате \*.jpg) прилагаются к статье в виде отдельных файлов (ris1.jpg, ris2.jpg и т.д.)

Сведения о финансовой поддержке работы приводятся в конце текста статьи перед списком литературы.

В СПИСКЕ ЛИТЕРАТУРЫ указываются авторы, название статьи, название журнала или сборника, год, номер, страницы. Для названия журналов используются общепринятые сокращения (<http://www.nlm.nih.gov/>).

В случае невыполнения настоящих правил оформления статья не принимается и отсылается авторам на доработку.

Редакция оставляет за собой право редактировать статьи по согласованию с автором.

Присланные в редакцию статьи проходят процедуру рецензирования. В случае отклонения статьи редакция направляет автору мотивированный отказ.

Публикация – бесплатная.

**Статьи направлять по адресу:**

**142279, Московская обл.,**

**Серпуховский р-н, п. Оболенск, ГНЦ ПМБ**

**Тел. (4967) 36-00-46**

**Факс (4967) 36-00-10**

**E-mail: [info@obolensk.org](mailto:info@obolensk.org)**

**или**

**[bacteriology@obolensk.org](mailto:bacteriology@obolensk.org)**