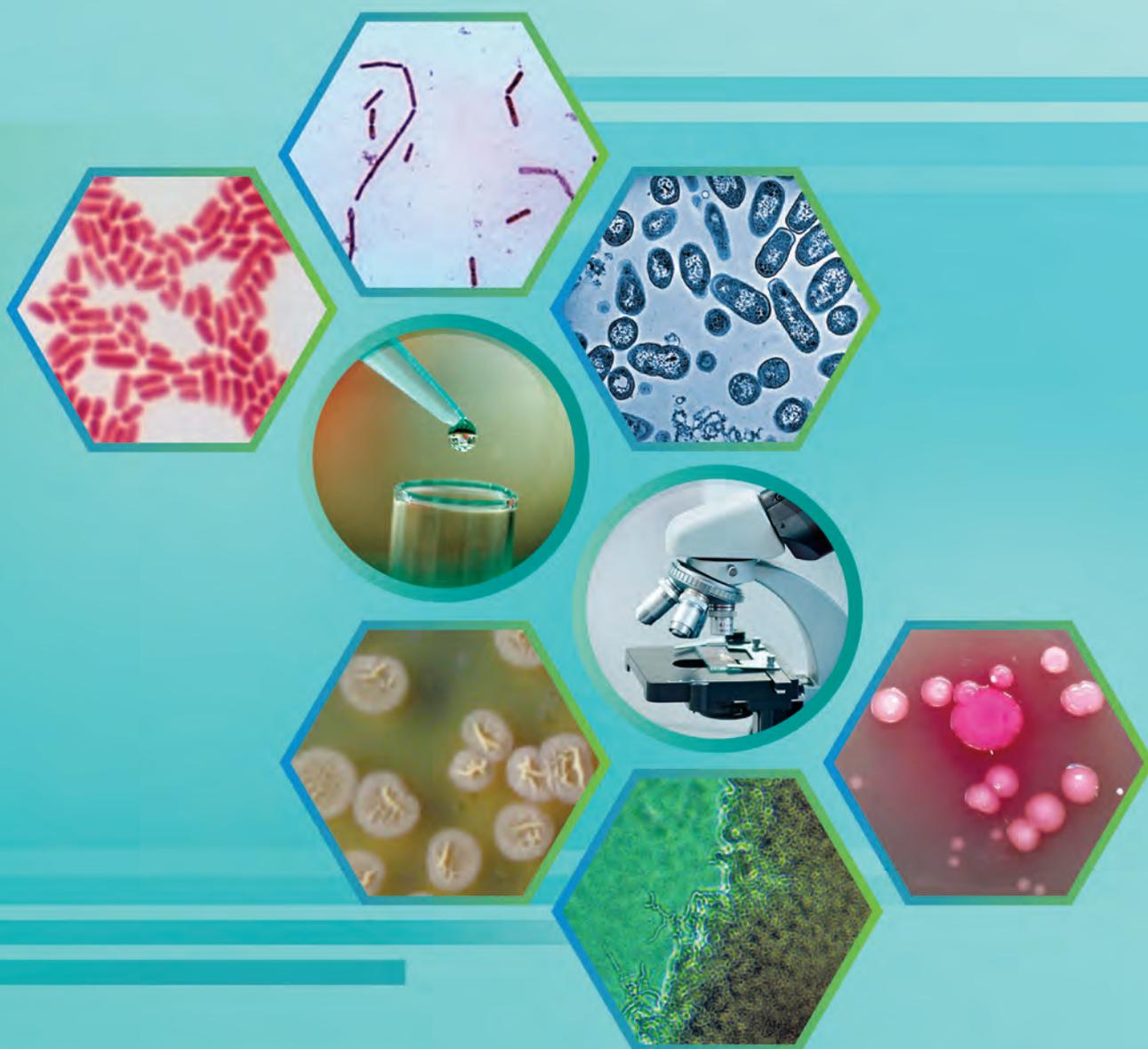


БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology

Бактериология · том 4 · №2 · 2019



2019 • ТОМ 4 • №2

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

Подписано в печать 27.06.2019 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

«Крылатые» гены резистентности. **5**

Аллельный полиморфизм гена *lef* у штаммов возбудителя сибирской язвы из государственной коллекции патогенных микроорганизмов («ГКПМ-Оболенск») Ю.О.Гончарова, И.В.Бахтеева, Г.М.Титарева, Р.И.Миронова, А.А.Кисличкина, Н.В.Майская, А.Н.Мокриевич, В.С.Тимофеев **7**

Новая модификация питательной среды для выделения *Pseudomonas aeruginosa* А.П.Шепелин, И.И.Марчихина, Л.П.Шолохова, О.В.Полосенко **13**

Особенности сезонной циркуляции *Vibrio cholerae* в поверхностных водоемах г. Ростова-на-Дону Е.М.Курбатова, Е.А.Меньшикова, И.В.Архангельская, Д.И.Левченко, В.Д.Кругликов, С.В.Титова, А.В.Миронова **21**

Биологическая и генетическая характеристика холерного бактериофага Rostov 7 Н.Е.Гаевская, М.П.Погожова, А.С.Водопьянов, Р.В.Писанов, Л.В.Романова, А.О.Аноприенко, С.Н.Головин, А.В.Тюрина **27**

Опыт выделения *Listeria monocytogenes* на территории Вологодской области Е.А.Алексеева, А.П.Шепелин, О.В.Полосенко **31**

Мониторинг психофизиологической адаптации специалистов, работающих с патогенными биологическими агентами I–II групп Т.А.Малюкова **37**

Внутривидовая дифференциация *Yersinia pestis*: от фенотипа к полногеномному секвенированию А.С.Вагайская, А.С.Трунякова, С.В.Дентовская **42**

45 лет ГНЦ ПМБ

Развитие инструментальных методов исследования бактерий в ГНЦ ПМБ И.Г.Говорунов **55**

Материалы V Национального конгресса бактериологов (дополнения)

Москва, 16–17 сентября 2019 г. **61**

К 90-летию со дня рождения

Вклад Ю.И.Соркина в изучение и профилактику сибирской язвы в Сибири и на Дальнем Востоке З.Ф.Дугаржапова, Е.В.Кравец, М.В.Чеснокова, Г.Ю.Соркина, С.А.Косилко, С.В.Балахонов **67**

Валентин Иванович Покровский **70**

Правила для авторов **74**

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

"Winged" resistance genes	5
Allelic polymorphism of the <i>lef</i> gene in anthrax pathogen strains from the State collection of pathogenic microorganisms («GKPM-Obolensk») <i>Yu.O.Goncharova, I.V.Bakhteeva, G.M.Titareva, R.I.Mironova, A.A.Kislichkina, N.V.Mayskaya, A.N.Mokrievich, V.S.Timofeev</i>	7
New nutrition modification for isolation of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>A.P.Shepelin, I.I.Marchikhina, L.P.Sholokhova, O.V.Polosenko</i>	13
Features of seasonal circulation of <i>Vibrio cholerae</i> in surface water bodies of Rostov-on-Don <i>E.M.Kurbatova, E.A.Menshikova, I.V.Arkhangel'skaya, D.I.Levchenko, V.D.Kruglikov, S.V.Titova, A.V.Mironova</i>	21
Biological and genetic characteristics of the cholera bacteriophage Rostov 7 <i>N.E.Gaevskaya, M.P.Pogozhova, A.S.Vodopyanov, R.V.Pisanov, L.V.Romanova, A.O.Anoprienko, S.N.Golovin, A.V.Tyurina</i>	27
Experience a selection of <i>Listeria monocytogenes</i> in the territory of the Vologda region <i>E.A.Alekseeva, A.P.Shepelin, O.V.Polosenko</i>	31
Monitoring of the psycho-physiological adaptation of the specialists working with pathogenic biological agents of the I-II groups of hazard <i>T.A.Malyukova</i>	37
Intraspecific differentiation of <i>Yersinia pestis</i> : from the phenotype to the full genome sequencing <i>A.S.Vagayskaya, A.S.Trunyakova, S.V.Dentovskaya</i>	42

45th anniversary of SRCAMB

Development of instrumental methods of studying bacteria in SCRAMB <i>I.G.Govorunov</i>	55
--	----

Materials of the V National Congress of Bacteriologists (Supplementation)

Moscow, September 16–17, 2019	61
--	----

To the 90th anniversary of the birth

Contribution of Yu.I.Sorkin to the study and prevention of anthrax in Siberia and the Far East <i>Z.F.Dugarzhapova, E.V.Kravets, M.V.Chesnokova, G.Yu.Sorkin, S.A.Kosilko, S.V.Balakhonov</i>	67
Valentin Ivanovich Pokrovsky	70
Instructions for Authors	74

«Крылатые» гены резистентности

Исследователям хорошо известны многочисленные молекулярно-генетические механизмы устойчивости бактерий к антибиотикам и пути распространения резистентных клонов как внутри отдельных стран, так и между странами и континентами. Основными факторами индуцирования устойчивости остаются нерациональное использование антибиотиков в медицине, огромное (тысячи тонн в отдельных странах) использование антибиотиков в сельском хозяйстве для стимуляции роста скота и профилактики инфекций, неконтролируемое уничтожение просроченных или некачественных антибиотиков не путем полной дезактивации, а выбрасыванием на мусорные свалки и др. Все это приводит к попаданию антибиотиков в почву, сточные воды, водоемы, реки и возвращается к потребителям этой воды – людям, вызывая в результате множественную устойчивость патогенов, циркулирующих в человеческой популяции.



Распространение факторов резистентности имеет и некоторые другие механизмы. Например, в Дании, где расположено большое количество свиноферм, передача метициллин-резистентных стафилококков отмечена между фермами при переносе ветром пыли от сухого навоза. Подобный механизм передачи инфекционных агентов характерен и для хозяйств, пораженных шигатоксинпродуцирующими эшерихиозами. Такие явления заставляют разрабатывать механизмы контроля за патогенами не только внутри хозяйств, но и для мониторинга окружающих фермы территорий, что важно для создания систем предотвращения распространения возбудителей.

В последние несколько лет появились сведения, вызывающие наибольшую тревогу в отношении механизмов распространения резистентных штаммов. В частности, в Китае, с помощью молекулярно-генетических методов выявлены идентичные штаммы энтеропатогенной кишечной палочки, циркулирующие на животноводческих фермах и в клиниках. И более того, такие же штаммы, устойчивые к колистину и карбапенему, выявлены у местных мух, которые могут переносить культуры из ферм в клиники. Это такой своеобразный трансмиссивный механический способ передачи инфекционного агента, но в современных условиях, по-видимому, представляющий значительную опасность.

Кроме того, были выявлены устойчивые бактерии в фекалиях от ласточек на фермах в Китае, что заставляет задуматься о возможности и такого распространения резистентных клонов между странами, так как птицы могут потреблять инфицированные корма на птицефермах.

Исследования семи клиник в Великобритании показали, что почти 90 процентов мух, обитающих в их окрестностях, переносили по крайней мере один вид патогенных бактерий, большинство из которых представляли собой вирулентные штаммы кишечной палочки и сальмонелл. Более того, половина выделенных бактерий несла в себе гены устойчивости хотя бы к одному из антибиотиков. Количество переносимых бактерий было незначительным для того, чтобы вызвать инфекционное заболевание при прямой передаче. Однако следует иметь в виду, что мухи имеют естественную тропность к пищевым блокам клиник и могут обсеменить пищевые продукты, что вызовет рост на них культур патогенов и образование токсинов. Такой механизм вполне вероятен и наверняка в ряде случаев имеет место.

Было также установлено, что наиболее многочисленной была группа мух *Diptera*, в значительно меньшей степени – *Hemiptera*, *Hymenoptera*, *Lepidoptera* и *Coleoptera*. Обследование на наличие бактерий проводилось в основном на первой группе мух, причем, кроме эшерихий и сальмонелл, в ряде случаев выделялись стафилококки, стрептококки, клостридии и микрококки.

Американские энтомологи методом анализа ДНК изучили спектр микроорганизмов, выявленных у комнатных и мясных мух соответственно – *Musca domestica* и *Chrysomya megacephala*. Оказалось, что комнатные мухи, распространенные повсеместно, переносили 351 вид бактерий, а мясные, локализующиеся преимущественно в южных регионах, – 316 видов бактерий, причем, большая часть этих микроорганизмов переносилась обоими видами мух.

Достоверным научным фактом является обнаружение в метагеномном анализе на лапках и крыльях мух патогенной бактерии *Helicobacter pylori*, вызывающей язву желудка и предположительно являющейся фактором риска развития рака желудка. Такое явление описано в научной литературе впервые и свидетельствует о том, что с помощью механического переноса бактерий насекомыми может быть осуществлена передача патогена практически любого вида и лабильности.

Таким образом, в последние годы накопились значительные научные данные о значении распространения вирулентных форм бактерий и их резистентных клонов механическим путем при перелете мух от источника инфекции к возможному месту ее дальнейшего распространения – клиники, пищеблоки и т.п. Эпидемиологическое значение такого явления, возможно, не полностью оценено, но факты имеют место и заставляют обратить внимание на данную проблему. Большая скученность населения в различных регионах мира, близость к городам сельскохозяйственных ферм и птицефабрик с сотнями тысяч особей, делают необходимой организацию системы надзора за явлением, описанным в данной рубрике, что позволит определить вклад процессов переноса насекомыми возбудителей внутрибольничных инфекций в их возникновение и поддержание, а также возможное значение этого процесса в развитии эпидемий.

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

Аллельный полиморфизм гена *lef* у штаммов возбудителя сибирской язвы из государственной коллекции патогенных микроорганизмов («ГКПМ-Оболенск»)

Ю.О.Гончарова, И.В.Бахтеева, Г.М.Титарева, Р.И.Миронова,
А.А.Кисличкина, Н.В.Майская, А.Н.Мокриевич, В.С.Тимофеев

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

Летальный фактор является одним из ключевых факторов патогенности сибиреязвенного микроба (*Bacillus anthracis*). В данной работе проанализированы нуклеотидные последовательности гена *lef*, кодирующего летальный фактор у 39 штаммов возбудителя сибирской язвы, депонированных в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск». В результате было выявлено 3 сиквенс-типа, один из которых идентичен последовательности гена *lef* референсного штамма *Ames Ancestor*, а два других содержат одну (2126A→G) и две (895G→A, 2126A→G) однонуклеотидные замены. Выявленные замены несинонимичны и приводят к аминокислотным заменам во II (266A→T) и IV (676 E→G) доменам белка LF соответственно. Они не влияют на функциональную активность летального фактора сибиреязвенного микроба.

Ключевые слова: сибирская язва, *Bacillus anthracis*, аллельный полиморфизм, летальный фактор

Для цитирования: Гончарова Ю.О., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Миронова Р.И., Кисличкина А.А., Майская Н.В., Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С. Аллельный полиморфизм гена *lef* у штаммов возбудителя сибирской язвы из государственной коллекции патогенных микроорганизмов («ГКПМ-Оболенск»). Бактериология. 2019; 4(2): 7–12. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-7-12

Allelic polymorphism of the *lef* gene in anthrax pathogen strains from the State collection of pathogenic microorganisms («GKPM-Obolensk»)

Yu.O.Goncharova, I.V.Bakhteeva, G.M.Titareva, R.I.Mironova,
A.A.Kislichkina, N.V.Mayskaya, A.N.Mokrievich, V.S.Timofeev

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

One of the key pathogenicity factors of the anthrax microbe (*Bacillus anthracis*) is the protein called Lethal factor (LF). In this work, we analyzed the allelic polymorphism of the *lef* gene encoding the lethal factor by the example of 39 B. anthracis strains deposited in the State Collection of Pathogenic Microorganisms «SCPM-Obolensk». As a result, 3 sequencetypes were identified, one of which is identical to the reference strain Ames Ancestor *lef* gene sequence, and the other two contain one (2126A → G) and two (895G → A, 2126A → G) point mutations which lead to amino acid substitutions in the II (266A → T) and IV (676 E → G) domains of the LF protein. Due to the high pathogenicity of the strains from the studied set, these substitutions do not seem to affect the functional activity of the B. anthracis lethal factor.

Keywords: anthrax, *Bacillus anthracis*, allelic polymorphism, lethal factor

For citation: Goncharova Yu.O., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Mironova R.I., Kislichkina A.A., Mayskaya N.V., Mokrievich A.N., Timofeev V.S. Allelic polymorphism of the *lef* gene in anthrax pathogen strains from the State collection of pathogenic microorganisms («GKPM-Obolensk»). Bacteriology. 2019; 4(2): 7–12. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-7-12

Сибирская язва – карантинная зоонозная инфекция, возбудителем которой является *Bacillus anthracis*, спорообразующая грамположительная бактерия, относящаяся ко II группе патогенности [1]. Источником инфекции являются

больные животные (крупный и мелкий рогатый скот, лошади, верблюды, свиньи, олени и др.), их трупы [2, 3] и почвенные очаги, возникающие на месте гибели и/или захоронения погибших от сибирской язвы животных. Споры

Для корреспонденции:

Тимофеев Виталий Сергеевич, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: timofeev_vitalii@mail.ru

Статья поступила 25.03.2019 г., принята к печати 27.06.2019 г.

For correspondence:

Vitaliy S. Timofeev, leading researcher of laboratory of microbiology of anthrax State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

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

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: timofeev_vitalii@mail.ru

The article was received 25.03.2019, accepted for publication 27.06.2019

B. anthracis при благоприятных условиях способны сохраняться в почве в жизнеспособном виде в течение сотен лет [4]. При этом ряд факторов может способствовать активизации таких почвенных очагов, ярким примером чего является вспышка сибирской язвы на полуострове Ямал летом 2016 г. [5].

Вирулентность *B. anthracis* обеспечивают две плазмиды – рХО1и рХО2, несущие гены синтеза токсина и поли- γ -глутаминовой капсулы соответственно [6]. Основное патогенное воздействие на организм хозяина осуществляет трехкомпонентный токсин. Его относят к семейству бактериальных бинарных токсинов АВ-типа. Он состоит из рецептор-связывающей В-части (протективный антиген (РА)) и двух эффекторных энзиматических А-частей (летальный фактор (LF) и отечный фактор (EF)). Непосредственно патогенное воздействие на молекулярные мишени клетки хозяина токсин оказывает только в виде комплексов протективного антигена с отечным фактором (РА-EF) и протективного антигена с летальным фактором (РА-LF) [7]. Гены, кодирующие компоненты токсина, локализованы на плазмиде рХО1: *суа* (EF), *lef* (LF), and *pagA* (РА). Контроль их экспрессии осуществляется регуляторными элементами *AtxA* и *PagR*, гены которых (*atxA*, *pagR*) также расположены на данной плазмиде [8, 9].

Функционально летальный фактор представляет собой цинк-металлопротеазу [10, 11], которая отщепляет N-концевой пролин-богатый участок у митоген-зависимых протеинкиназ киназ (МАРКК, или Мек), приводя к ингибированию сигнальных путей в клетке хозяина [12].

В настоящее время активно изучается аллельный полиморфизм факторов патогенности у различных патогенных микроорганизмов, что позволяет не только оценить роль отдельных аминокислотных замен в патогенезе, но и изучить эволюцию этих белков. В частности, такие работы проводятся для возбудителей холеры [13] и чумы [14–16].

Что касается сибиреязвенного микроба, существует ряд работ, изучающих роль различных аминокислот в функциональной активности белка LF [10–12, 17–20]. Но в них исследуются лабораторные мутантные штаммы и рекомбинантные белки, распространенность тех или иных аллелей летального фактора у природных штаммов *B. anthracis* остается неизученной.

В данной работе мы на основе данных полногеномного секвенирования изучили аллельный полиморфизм гена летального фактора на выборке из 38 природных и одного вакцинного штамма сибиреязвенного микроба из нашей коллекции.

Таблица 1. Перечень используемых штаммов

Штамм <i>B. anthracis</i>	Место выделения	Дата выделения	Источник
44	Н/Д	Н/Д	Н/Д
1173	Ставропольский край	19.07.1995	Труп коровы
1183	Кабардино-Балкарская республика	21.07.1998	Почва с места забоя КРС после дезинфекции
1199	Дагестан	30.10.1998	Материал от больного человека
1259	Ставропольский край	27.09.2004	Мясо барана
1273	Волгоградская обл.	19.09.2008	Материал от больного человека
1298	Волгоград	09.08.2010	Сод. везик. больного человека
53169	Н/Д	Н/Д	Н/Д
1(14) Stavropol	Украина	13.11.1957	Шкура козы, завезенная из Эфиопии
1030/213	Карачаево-Черкессия	Н/Д	Н/Д
1055/38	Самарская обл.	15.04.1993	Смыв с одежды в очаге сибирской язвы
1056/51	Ставропольский край	21.07.1993	Труп человека
11(1940)	Туркменистан	24.05.1971	Труп яка
15(1345)	Таджикистан	24.05.1971	Труп коровы
157(B-1107)	Эстония	01.11.1978	Труп коровы
219/6	Узбекистан	29.08.1976	Труп КРС
331/214	Азербайджан	14.09.1979	Почва
34(738)	Казахстан	Май 21972	Труп коровы
367/17	Тульская обл.	14.07.1979	Труп человека
46/27	Чечено-Ингушетия	01.07.1968	Соскоб со стены
47/28	Чечено-Ингушетия	29.07.1968	Н/Д
48/29	Чечено-Ингушетия	13.08.1968	Н/Д
52/33	Чечено-Ингушетия	23.08.1968	Н/Д
531/17	Калмыкия	28.08.1981	Труп человека
546/714	Воронежская обл.	19.06.1982	Материал от больного человека
555/288	Оренбургская обл.	28.07.1982	Материал от больного человека
592/10	Молдавия	20.10.1982	Сточные воды кожевенного завода до очистки
644/268	Украина	Н/Д	Почва скотомогильника
68/12	Азербайджан	12.08.1967	Содержимое карбункула больного человека
7(992)	Новгородская область	01.06.1967	Труп коровы
8(2099)	Татарстан	01.10.1971	Труп коровы
822/7	Чечено-Ингушетия	27.08.1986	Содержимое карбункула больного человека
914/213	Чечено-Ингушетия	05.07.1988	Сушеное мясо
I-271	ЯНАО	Н/Д	Труп оленя
I-364	Бурятия	10.07.2008	Труп овцы
LP50/3YA	Якутия	2016	Глубокие слои почвы
LP51/4YA	Якутия	2017	Глубокие слои почвы
LP53/5YA	Якутия	2018	Глубокие слои почвы
STI-1	Лабораторный штамм	1940	

*Н/Д – нет данных.

Материалы и методы

Штаммы

В работе были исследованы 39 штаммов *B. anthracis* из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» (табл. 1).

Среды и условия культивирования

Культуры исследуемых штаммов выращивали на твердой среде Luria Agar (Sigma-Aldrich) в течение 8–12 часов при 37°C.

Выделение ДНК и секвенирование

Выделение ДНК осуществляли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (ThermoFisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Полногеномное секвенирование проводилось на платформе Illumina MiSeq (США).

Сборка геномов и *in silico* анализ

Сборки последовательностей плазмиды pXO1 осуществляли на матрицу референсного генома *B. anthracis* Ames Ancestor (plasmid pXO1, GenBank: AE017336.2) с помощью программного пакета программы DNASTAR Lasergene (США), <https://www.dnastar.com/software/lasergene/>

Множественное выравнивание, трансляция *in silico* и филогенетический анализ проводились с помощью пакета программ Vector NTI 10.0.1. (Invitrogen Corporation, США), и MEGA 7.0 (<http://www.megasoftware.net>) [21].

Индексы разнообразия Симпсона рассчитывали по следующей формуле:

$$D = 1 - n(n-1)/N(N-1),$$

где N – число исследуемых штаммов в выборке; n – число штаммов, относящихся к J-генотипу (число штаммов в генотипе) [22].

Результаты и обсуждение

В исследованной выборке, состоящей из последовательностей геномов 39 штаммов *B. anthracis* из «ГКПМ-Оболенск» и депонированного в GenBank генома референсного штамма Ames Ancestor (GenBank: AE017336.2), было выявлено три сиквенс-типа гена летального фактора *lef*, включая исходный, аналогичный сиквенс-типу референсного штамма (сиквенс-тип №1), и два измененных. В двух «мутантных» сиквенс-типах была выявлена общая для них однонуклеотидная замена 2126A→G. Отличие сиквенс-типа №2 от исходного ограничивается только ею, а у сиквенс-типа №3 была обнаружена дополнительная замена 895G→A (табл. 2). Учитывая относительно большую длину гена *lef* (2430 п.о.) и достаточный размер исследованной выборки ($n = 40$), обнаружение всего двух мутаций (одна из которых встречается всего у четырех штаммов) говорит об относительно высоком консерватизме последовательности гена *lef*. В численном выражении это подтверждается значением индекса биоразнообразия Симпсона $D = 0,598718$.

Факторы патогенности других микроорганизмов проявляют более выраженный аллельный полиморфизм. Так, Анисимов А.П. и соавт. [14] при анализе 19 последовательностей гена V-антигена (*LcrV*) *Yersinia pestis* длиной 981 п.о. смогли идентифицировать пять сиквенс-типов. Следует отметить, что при анализе данных полногеномного секвенирования *B. anthracis* мы обнаруживали одну одно-

нуклеотидную замену на 2,8–3,2. т.п.о. (данные не приводятся), что также указывает на консерватизм генома сибиреязвенного микроба. Этот консерватизм, скорее всего, является отражением короткой эволюционной истории данного патогена и особенностями его жизненного цикла.

Для определения влияния обнаруженных однонуклеотидных замен на аминокислотную последовательность белка LF была проведена трансляция *in silico* трех выявленных сиквенс-типов гена *lef*. При этом оказалось, что обе выявленные нуклеотидные замены 895G→A и 2126A→G не являются синонимичными и приводят к заменам в аминокислотной последовательности транслированного белка – аланина на треонин в 299 положении и глутаминовой кислоты на глицин в 709 положении соответственно. Однако проведенная *in silico* трансляция не учитывает того, что белок LF подвергается посттрансляционной модификации – отщеплению N-концевой сигнальной последовательности размером 33 аминокислоты. Эта модификация не является необходимой для каталитической активности летального фактора,

Таблица 2. Распределение штаммов *B. anthracis* по сиквенс-типам гена *lef*

№ сиквенс-типа	Описание мутации	Количество мутаций	Штаммы <i>B. anthracis</i>	Количество штаммов	Частота встречаемости сиквенс-типа
1	нет	0	Ames Ancestor 1199 53169 LP51/4YA 1-271 34(738) 15(1345) 1259 644/268 1273 52/33 1055/38 331/214 592/10 822/7 8(2099) 11(1940) 1173 STI-1	19	0,475
2	2126A→G	1	1(14)Stavropol LP50/3YA 68/12 367/17 531/17 7(992) 914/213 1298 1020/213 1183 219/6 1056/51 46/27 546/714 555/288 47/28 48/29	17	0,425
3	895G→A 2126A→G	2	LP53/5YA 1-364 44 157(B-1107)	4	0,1

Таблица 3. Аминокислотные замены в летальном факторе, обнаруженные при трансляции *in silico* исследуемой выборки штаммов

Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Координаты замещенной аминокислоты в непроцессированном белке	Домен белка LF	Число штаммов
895G→A	A→T	299	II	4
2126A→G	E→G	709	IV	21

но она обеспечивает возможность секреции этого белка из клетки патогена во внешнюю среду, то есть в организм хозяина [23]. После этой модификации размер летального фактора сокращается с 809 до 776 аминокислот, и координаты выявленных аминокислотных замен в процессированном белке оказываются сдвинутыми на 33 позиции (табл. 3).

Истинное положение выявленных замен важно для определения их локализации в том или ином домене белка LF. В структуре летального фактора выделяют 4 домена:

(1) N-концевой домен I 1 – 263 а. к., обеспечивает связывание LF с протективным антигеном; (2) домен II состоит из двух участков: 263–297 и 385–550 а. к., он имеет структурное сходство с ADP-рибозилирующим токсином VIP2 *B. cereus*, но потерял последовательность, необходимую для связывания NAD и катализа, и кроме того, приобрел замену глутаминовой кислоты в 518 положении, необходимой для активности ADP-рибозилирующих токсинов на лизин. Этот домен может играть роль в распознавании C-концевой части субстрата; (3) домен III расположен на участке 303–382 а. к., внутри домена II, между его второй и третьей α-спиралями, включает 282–382 а.к., представлен пятикратным тандемным повтором. Домен III необходим для распознавания субстрата; (4) C-концевой домен IV расположен на участке 552–776 а.к., внутри него находится цинк-связывающий сайт каталитический центр (686–690 а.к.) с классическим мотивом His686–Glu687–X–X–His690 [12, 24].

Картируя выявленные нами мутации на координаты расположения доменов в летальном факторе, мы можем заключить, что:

- 1) уникальная для сиквенс-типа №3 замена 266A→T затрагивает третью аминокислоту II домена с N-конца;
- 2) общая для сиквенс-типов №№1 и 2 замена 676 E→G расположена в IV домене за пределами каталитического центра (686–690 а.к.).

Учитывая, что все сиквенс-типы представлены вирулентными штаммами, за исключением вакцинного штамма СТИ-1 (СТИ-1), можно утверждать, что выявленные мутации не снижают функциональной роли белка LF. Если они и влияют на каталитическую активность летального фактора, эти изменения слишком незначительны и не приводят к утере вирулентности штаммов.

Замена 676 E→G достаточно широко распространена, встречаясь более чем у половины исследованной выборки, что позволяет предположить ее широкое распространение в глобальной популяции сибиреязвенного микроба.

Вторая выявленная нами мутация 266A→T, напротив, обнаружена только у сиквенс-типа №3, представленного всего лишь четырьмя штаммами. Интересно, что несмотря на малочисленность данной группы, ранее было показано, что все штаммы этого сиквенс-типа являются филогенетически близкими между собой как по MLVA-, так и по SNP-профилю, входя в отдельный «сибирский» кластер в рамках эволюционной линии «В» вместе со штаммами, выделенными на Ямале в ходе вспышки сибирской язвы в 2016 г. (не вошли в данное исследование) [4]. Следовательно, можно предположить, что она является характерной для штаммов *B. anthracis*, эндемичных для Сибири, и является значимой с точки зрения эволюции и филогеографии сибиреязвенного микроба (рисунок).

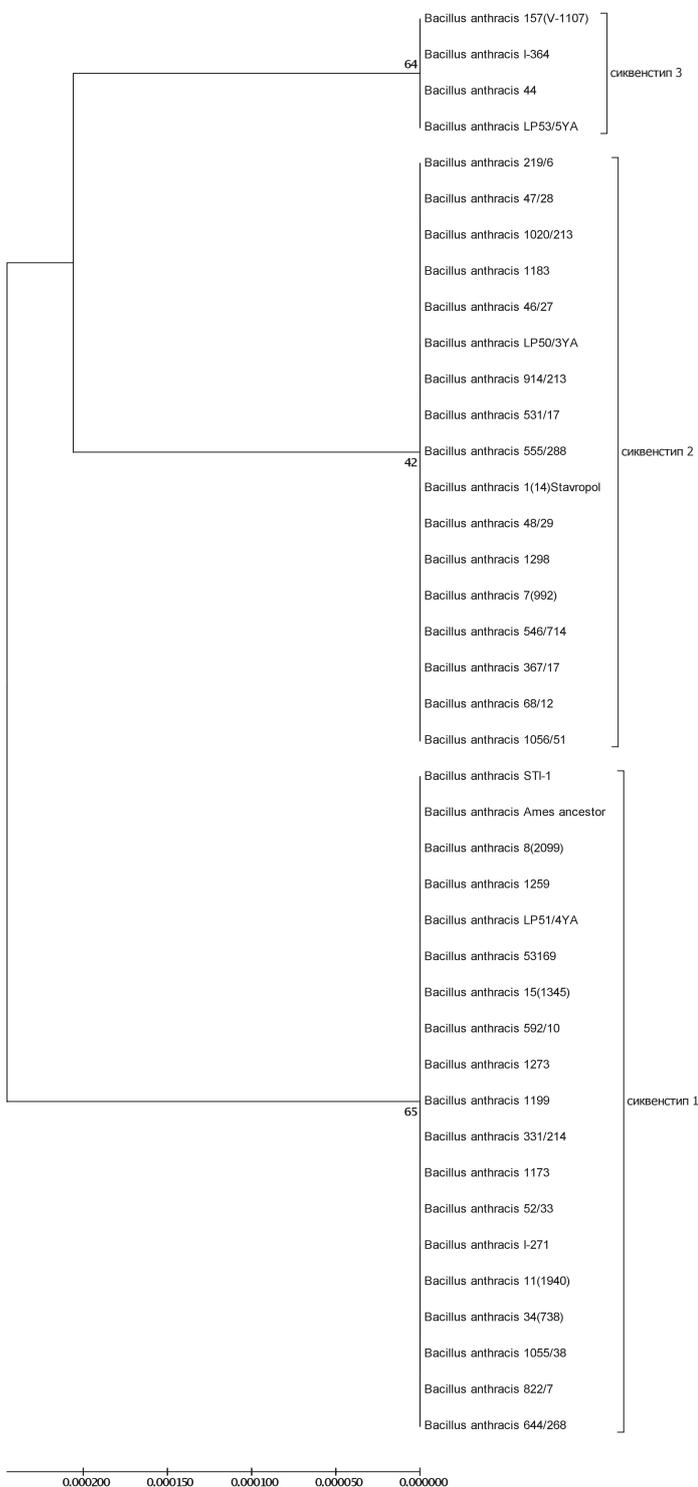


Рисунок. Филогенетическое дерево, построенное по алгоритму UPGMA, для последовательностей гена *lef* штаммов исследуемой выборки и референсного штамма *Ames Ancestor*.

Таким образом, аллельный полиморфизм гена *lef* в изученной выборке штаммов *B. anthracis* не влияет на функцию белка и достаточно ограниченно отражает филогенетическую структуру глобальной популяции сибиреязвенного микроба. Хотя, тем не менее, нуклеотидная замена 895G→A позволила нам дифференцировать сибирский кластер штаммов в пределах эволюционной линии B.

Литература

1. Маринин ЛИ, Онищенко ГГ, Кравченко ТБ, Дятлов ИА, и др. Сибирская язва человека: эпидемиология, профилактика, диагностика, лечение. М.: Гигиена; 2008, 416 с.
2. Симонова ЕГ, Картава СА, Титков АВ, Локтионова МН, Раичич СР, Толпин ВА, и др. Сибирская язва на Ямале: оценка эпизоотологических и эпидемиологических рисков. Проблемы особо опасных инфекций. 2017;1:89-93. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-89-93
3. Покровский ВИ, Пак СГ, Брико НИ, Данилкин БК. Инфекционные болезни и эпидемиология. Учебник. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007, 816 с.
4. Timofeev V, Bahtejeva I, Mironova R, Titareva G, Lev I, Christiany D, et al. Insights from *Bacillus anthracis* strains isolated from permafrost in the tundra zone of Russia. PLoS One. 2019 May 22;14(5):e0209140. DOI: 10.1371/journal.pone.0209140
5. Куличенко АН, Еременко ИГ, Рязанова АГ, Аксенова ЛЮ, Ковалев ДА, Писаренко СВ, и др. Биологические свойства и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных во время вспышки сибирской язвы в Ямало-ненецком автономном округе в 2016 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2017;1:94-9. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-94-99
6. Xu Q, Zeng M. Detoxified lethal toxin as a potential mucosal vaccine against anthrax. Clin Vaccine Immunol. 2008 Apr;15(4):612-6. DOI: 10.1128/CVI.00402-07
7. Wu G, Feng C, Cao S, Guo A, Liu Z. Identification of new dominant-negative mutants of anthrax protective antigen using directed evolution. Appl Biochem Biotechnol. 2012 Nov;168(5):1302-10. DOI: 10.1007/s12010-012-9858-6.
8. Bourgogne A, Drysdale M, Hilsenbeck SG, Peterson SN, Koehler TM. Global effects of virulence gene regulators in a *Bacillus anthracis* strain with both virulence plasmids. Infect Immun. 2003 May;71(5):2736-43.
9. Bergman NH. (ed). *Bacillus anthracis* and anthrax. Wiley-Blackwell; 2011. ISBN 978-0-470-41011-0
10. Cao S, Guo A, Wu G, Liu Z, Chen W, Feng C, Zhang CC, Chen H. Residue histidine 669 is essential for the catalytic activity of *Bacillus anthracis* lethal factor. J Bacteriol. 2010 Nov;192(21):5799-805. DOI: 10.1128/JB.00485-10
11. Klimpel KR, Arora N, Leppla SH. Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. Mol Microbiol. 1994 Sep;13(6):1093-100. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00500.x
12. Pannifer AD, Wong TY, Schwarzenbacher R, Renucci M, Petosa C, Bienkowska J, et al. Crystal structure of the anthrax lethal factor. Nature. 2001 Nov 8;414(6860):229-33. DOI: 10.1038/n35101998
13. Teh CS, Chua KH, Thong KL. Genetic variation analysis of *Vibrio cholerae* using multilocus sequencing typing and multi-virulence locus sequencing typing. Infect Genet Evol. 2011 Jul;11(5):1121-8. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.04.005
14. Anisimov AP, Dentovskaya SV, Panfertsev EA, Svetoch TE, Kopylov PKh, Segelke BW, et al. Amino acid and structural variability of *Yersinia pestis* LcrV protein. Infect Genet Evol. 2010 Jan;10(1):137-45. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.10.003
15. Dentovskaya SV, Platonov ME, Svetoch TE, Kopylov PK, Kombarova TI, Ivanov SA, et al. Two isoforms of *Yersinia pestis* plasminogen activator pla: intraspecies distribution, intrinsic disorder propensity, and contribution to virulence. PLoS One. 2016 Dec 9;11(12):e0168089. DOI: 10.1371/journal.pone.0168089.
16. Kopylov PK, Platonov ME, Ablamunits VG, Kombarova TI, Ivanov SA, Kadnikova LA, et al. *Yersinia pestis* Caf1 protein: effect of sequence polymorphism on intrinsic disorder propensity, serological cross-reactivity and cross-protectivity of isoforms. PLoS One. 2016 Sep 8;11(9):e0162308. DOI: 10.1371/journal.pone.0162308
17. Tonello F, Naletto L, Romanello V, Dal Molin F, Montecucco C. Tyrosine-728 and glutamic acid-735 are essential for the metalloproteolytic activity of the lethal factor of *Bacillus anthracis*. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jan 16; 313(3):496-502.
18. Cao S, Liu Z, Guo A, Li Y, Zhang C, Gaobing W, et al. Efficient production and characterization of *Bacillus anthracis* lethal factor and a novel inactive mutant rLFm-Y236F. Protein Expr Purif. 2008 May;59(1):25-30. DOI: 10.1016/j.pep.2007.12.013
19. Gupta M, Alam S, Bhatnagar R. Catalytically inactive anthrax toxin(s) are potential prophylactic agents. Vaccine. 2007 Dec 5;25(50):8410-9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.09.063
20. Lacy DB, Mourez M, Fouassier A, Collier RJ. Mapping the anthrax protective antigen binding site on the lethal and edema factors. J Biol Chem. 2002 Jan 25; 277(4):3006-10.
21. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol. 2016 Jul;33(7):1870-4. DOI: 10.1093/molbev/msw054
22. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol. 1988 Nov;26(11):2465-6.
23. Bragg TS, Robertson DL. Nucleotide sequence and analysis of the lethal factor gene (*lef*) from *Bacillus anthracis*. Gene. 1989 Sep 1;81(1):45-54. DOI: 10.1016/0378-1119(89)90335-1
24. Frankel AE, Kuo SR, Dostal D, Watson L, Duesbery NS, Cheng CP, et al. Pathophysiology of anthrax. Front Biosci (Landmark Ed). 2009 Jan 1;14:4516-24. DOI: 10.2741/3544

References

1. Marinin LI, Onishchenko GG, Kravchenko TB, Dyatlov IA, et al. Sibirskaya yazva cheloveka: epidemiologiya, profilaktika, diagnostika, lechenie [Human anthrax: epidemiology, prevention, diagnosis, treatment]. Moscow: "Gigiena" Publ.; 2008, 416 p. (In Russian).
2. Simonova EG, Kartavaya SA, Titkov AV, Loktionova MN, Raichich SR, Tolpin VA, et al. Anthrax in the territory of Yamal: assessment of epizootiological and epidemiological risks. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2017;1:89-93. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-89-93(In Russian).
3. Pokrovskii VI, Pak SG, Briko NI, Danilkin BK. Infektsionnye bolezni i epidemiologiya [Infectious diseases and epidemiology]. Moscow: "GEOTAR-Media" Publ.; 2007, 816 p. (In Russian).
4. Timofeev V, Bahtejeva I, Mironova R, Titareva G, Lev I, Christiany D, et al. Insights from *Bacillus anthracis* strains isolated from permafrost in the tundra zone of Russia. PLoS One. 2019 May 22;14(5):e0209140. DOI: 10.1371/journal.pone.0209140
5. Kulichenko AN, Eremenko EI, Ryazanova AG, Aksanova LYu, Kovalev DA, Pisarenko SV, et al. Biological properties and molecular-genetic characteristics of *Bacillus anthracis* strains, isolated during the outbreak of anthrax in the Yamalo-Nenets Autonomous District in 2016. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2017;1:94-9. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-94-99 (In Russian).
6. Xu Q, Zeng M. Detoxified lethal toxin as a potential mucosal vaccine against anthrax. Clin Vaccine Immunol. 2008 Apr;15(4):612-6. DOI: 10.1128/CVI.00402-07
7. Wu G, Feng C, Cao S, Guo A, Liu Z. Identification of new dominant-negative mutants of anthrax protective antigen using directed evolution. Appl Biochem Biotechnol. 2012 Nov;168(5):1302-10. DOI: 10.1007/s12010-012-9858-6.
8. Bourgogne A, Drysdale M, Hilsenbeck SG, Peterson SN, Koehler TM. Global effects of virulence gene regulators in a *Bacillus anthracis* strain with both virulence plasmids. Infect Immun. 2003 May;71(5):2736-43.
9. Bergman NH. (ed). *Bacillus anthracis* and anthrax. Wiley-Blackwell; 2011. ISBN 978-0-470-41011-0

10. Cao S, Guo A, Wu G, Liu Z, Chen W, Feng C, Zhang CC, Chen H. Residue histidine 669 is essential for the catalytic activity of *Bacillus anthracis* lethal factor. J Bacteriol. 2010 Nov;192(21):5799-805. DOI: 10.1128/JB.00485-10
11. Klimpel KR, Arora N, Leppla SH. Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. Mol Microbiol. 1994 Sep;13(6):1093-100. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00500.x
12. Pannifer AD, Wong TY, Schwarzenbacher R, Renucci M, Petosa C, Bienkowska J, et al. Crystal structure of the anthrax lethal factor. Nature. 2001 Nov 8;414(6860):229-33. DOI: 10.1038/n35101998
13. Teh CS, Chua KH, Thong KL. Genetic variation analysis of *Vibrio cholerae* using multilocus sequencing typing and multi-virulence locus sequencing typing. Infect Genet Evol. 2011 Jul;11(5):1121-8. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.04.005
14. Anisimov AP, Dentovskaya SV, Panfertsev EA, Svetoch TE, Kopylov PK, Segelke BW, et al. Amino acid and structural variability of *Yersinia pestis* LcrV protein. Infect Genet Evol. 2010 Jan;10(1):137-45. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.10.003
15. Dentovskaya SV, Platonov ME, Svetoch TE, Kopylov PK, Kombarova TI, Ivanov SA, et al. Two isoforms of *Yersinia pestis* plasminogen activator pla: intraspecies distribution, intrinsic disorder propensity, and contribution to virulence. PLoS One. 2016 Dec 9;11(12):e0168089. DOI: 10.1371/journal.pone.0168089.
16. Kopylov PK, Platonov ME, Ablamunits VG, Kombarova TI, Ivanov SA, Kadnikova LA, et al. *Yersinia pestis* Caf1 protein: effect of sequence polymorphism on intrinsic disorder propensity, serological cross-reactivity and cross-protectivity of isoforms. PLoS One. 2016 Sep 8;11(9):e0162308. DOI: 10.1371/journal.pone.0162308
17. Tonello F, Naletto L, Romanello V, Dal Molin F, Montecucco C. Tyrosine-728 and glutamic acid-735 are essential for the metalloproteolytic activity of the lethal factor of *Bacillus anthracis*. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jan 16;313(3):496-502.
18. Cao S, Liu Z, Guo A, Li Y, Zhang C, Gaobing W, et al. Efficient production and characterization of *Bacillus anthracis* lethal factor and a novel inactive mutant rLFm-Y236F. Protein Expr Purif. 2008 May;59(1):25-30. DOI: 10.1016/j.pep.2007.12.013
19. Gupta M, Alam S, Bhatnagar R. Catalytically inactive anthrax toxin(s) are potential prophylactic agents. Vaccine. 2007 Dec 5;25(50):8410-9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.09.063
20. Lacy DB, Mourez M, Fouassier A, Collier RJ. Mapping the anthrax protective antigen binding site on the lethal and edema factors. J Biol Chem. 2002 Jan 25;277(4):3006-10.
21. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol. 2016 Jul;33(7):1870-4. DOI: 10.1093/molbev/msw054
22. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol. 1988 Nov;26(11):2465-6.
23. Bragg TS, Robertson DL. Nucleotide sequence and analysis of the lethal factor gene (*lef*) from *Bacillus anthracis*. Gene. 1989 Sep 1;81(1):45-54. DOI: 10.1016/0378-1119(89)90335-1
24. Frankel AE, Kuo SR, Dostal D, Watson L, Duesbery NS, Cheng CP, et al. Pathophysiology of anthrax. Front Biosci (Landmark Ed). 2009 Jan 1;14:4516-24. DOI: 10.2741/3544

Информация об авторах:

Гончарова Юлия Олеговна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: iulia.belay@yandex.ru

Бахтеева Ирина Викторовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: bahtejeva@mail.ru

Титарева Галина Михайловна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: titarevag@mail.ru

Миронова Раиса Ивановна, научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы 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

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) 36-0003
E-mail: kislichkina@obolensk.org

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) 36-0003
E-mail: mayskaya_nv@mail.ru

Мокриевич Александр Николаевич, доктор медицинских наук, заведующий отделом особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: mokrievich@obolensk.org

Information about authors:

Julia O. Goncharova, junior researcher, laboratory of microbiology of anthrax, State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: iulia.belay@yandex.ru

Irina V. Bakhteeva, PhD (in Biology), senior researcher, laboratory of microbiology of anthrax, State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: bahtejeva@mail.ru

Galina M. Titareva, PhD (in Biology), senior researcher, laboratory of microbiology of anthrax, State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: titarevag@mail.ru

Raisa I. Mironova, Researcher, senior researcher, laboratory of microbiology of anthrax, State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Angelina A. Kislichkina, PhD (in Biology), senior researcher of microbial collection department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: kislichkina@obolensk.org

Nadezhda V. Mayskaya, researcher of microbial collection department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: mayskaya_nv@mail.ru

Alexander N. Mokrievich, MD, PhD, DSc, head of the department of highly dangerous infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: mokrievich@obolensk.org

Новая модификация питательной среды для выделения *Pseudomonas aeruginosa*

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

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

Выделенная и описанная более ста лет назад синегнойная палочка является серьезной проблемой в различных областях жизни и по настоящее время. Возрастает роль синегнойной палочки в удельном весе известных возбудителей септических осложнений и возникновении внутрибольничных инфекций. Спектр проблем возникает и в процессе эксплуатации бассейнов, где в межплиточном пространстве они создают целые колонии и могут сохранять жизнеспособность в воде в течение длительного времени. Синегнойная палочка легко приспосабливается к большинству антибиотиков, устойчива даже к очень высоким их концентрациям. Патогенна для человека. Необходимость унифицировать методы лабораторных исследований по выделению и идентификации микроорганизмов рода *Pseudomonas* остается актуальной, следовательно, необходимы разработка новых и модификация имеющихся питательных сред для выделения псевдомонад.

Ключевые слова: псевдомонады, фенозан, бутилгидрокситолуол, специфическая активность, пигментообразование, ингибирующие свойства

Для цитирования: Шепелин А.П., Марчихина И.И., Шолохова Л.П., Полосенко О.В. Новая модификация питательной среды для выделения *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериология. 2019; 4(2): 13–20. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-13-20

New nutrition modification for isolation of *Pseudomonas aeruginosa*

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

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

Pseudomonas aeruginosa have been isolated and described more than a hundred years ago, is a serious problem in various areas of life today. The role of this microorganism among the known causative agents of septic complications and the occurrence of nosocomial infections is increasing. A range of problems also arises in the process of operating pools, where in the inter-tile space they create entire colonies and can remain viable in water for a long time. *Pseudomonas aeruginosa* easily adapts to most antibiotics, including very high concentrations. It is pathogenic to humans. The need to unify laboratory research methods for the isolation and identification of microorganisms of the genus *Pseudomonas* remains relevant, therefore, it is necessary to develop new and modify existing nutrient media for the isolation of pseudomonads.

Keywords: *Pseudomonas*, phenosan, butylhydroxytoluene, specific activity, pigmentation, inhibitory properties

For citation: Shepelin A.P., Marchikhina I.I., Sholokhova L.P., Polosenko O.V. New nutrition modification for isolation of *Pseudomonas aeruginosa*. Bacteriology. 2019; 4(2): 13–20. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-13-20

Род *Pseudomonas* включает 18 видов, но наибольшую важность для медицины, ветеринарии и санитарии представляют *P. aeruginosa*, *P. mallei* и *P. pseudomallei*. Псевдомонады неприхотливы по питательным потребностям и способны выживать почти при полном отсутствии источников питания [1].

Псевдомонады, являясь нетребовательными к питательным веществам микроорганизмами, можно изолировать на

любых простых жидких и плотных питательных средах. Представители рода *Pseudomonas* отличаются высокой ферментативной активностью и разлагают разнообразные белки и жиры, углеводы они ферментируют сравнительно редко и усваивают их путем окисления.

Ввиду того, что *P. aeruginosa* довольно часто находится в ассоциации с другими микроорганизмами, для ее одноступенчатого выделения используется ряд элективных и

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 22.03.2019 г., принята к печати 27.06.2019 г.

For correspondence:

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

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

Phone: (4967) 36-0020

E-mail: shepelin@obolensk.org

The article was received 22.03.2019, accepted for publication 27.06.2019

дифференциально-диагностических сред. Среды должны содержать источник питания, обеспечивающий рост только синегнойной палочки, либо компоненты, подавляющие рост ассоциативной микрофлоры, не задерживая при этом ее собственный рост.

В принципах селективного выделения и дифференциации псевдомонад от других грамотрицательных бактерий с применением питательных сред использована уникальная способность *P. aeruginosa* синтезировать водорастворимый феназиновый пигмент – пиоцианин, окрашивающий питательную среду в сине-зеленый цвет. Кроме того, большинство культур образуют зеленый, флуоресцирующий в ультрафиолетовых лучах пигмент флуоресцеин или пиовердин, а также другие пигменты (пиорубин, пиомеланин, аоксифеназин), но в некоторых случаях выявляются атипичные беспигментные или слабопигментированные формы, что объясняется действием сопутствующей микрофлоры, антибиотиков, недостатком кислорода. Выявление способности *P. aeruginosa* к образованию на плотных средах блестящего металлического налета нестабильно и в значительной степени зависит от состава среды культивирования [1].

Цель исследования – изучение влияния антиоксидантов фенозан-кислоты (3-(3,5-дитретбутил-4-оксифенил) пропионовая кислота) и бутилгидрокситолуола (2,6-Бис(1,1-диметилэтил)-4-метилфенол) (БГТ) на рост псевдомонад и ассоциативных микроорганизмов, а также возможности замены дорогостоящего импортного антиоксиданта на более дешевый отечественного производства.

Материалы и методы

На территории РФ для выявления псевдомонад действующими нормативными документами являются: методические рекомендации «Выделение и идентификация штаммов синегнойной палочки из клинического материала» и «Обнаружение и идентификация *Pseudomonas aeruginosa* в объектах окружающей среды (пищевых продуктах, воде, сточных жидкостях)», ГОСТ 10444.15-94 «Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов», ГОСТ Р 54755-2011 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*», ГФ XIV т.1 (ОФС. 1.2.4.0002.18), которые регламентируют набор питательных сред для проведения исследований [2–6].

Выделение на питательной среде чистых культур микроорганизмов с характерными для псевдомонад культуральными, морфологическими и тинкториальными свойствами требует постановки целого ряда подтверждающих тестов, а следовательно, значительного времени и материальных затрат.

Существующие среды имеют довольно сложную рецептуру и могут содержать дорогостоящие компоненты импортного производства.

Разработка селективных сред ориентирована на химические соединения, ингибирующие рост бактерий-ассоциантов *P. aeruginosa*. В связи с резистентностью к нитрофурановым препаратам для выделения псевдомонад предложены пита-

тельные среды, в состав которых вводится одно из соединений названной группы. За рубежом распространение получили сухие среды, содержащие в качестве селективного агента цетилтриметиламмоний бромид, или цетримид. В России была разработана сухая среда, состоящая из селективного агента отечественного производства – N-цетилпиридиния хлорида (N-ЦПХ) в концентрации 0,2%, а также питательной основы из сухого пептического гидролизата казеина и минеральных солей магния, калия. Детергент N-ЦПХ в концентрации 0,2–0,5% надежно угнетает рост стафилококков, стрептококков и энтеробактерий, однако при этом ингибируются и отдельные клинические штаммы синегнойной палочки. Затем, для улучшения селективных свойств, А.Ф.Мороз и соавт. ввели в состав среды фенозан, и было начато промышленное производство ЦПХ-агара с фенозаном, который был рекомендован для выделения *P. aeruginosa* наряду с ацетамидным агаром [7, 8].

Выбор специфической питательной среды для выявления псевдомонад будет всегда зависеть от типа исследуемого образца или поставленной задачи: качественное обнаружение или количественный учет.

Несмотря на то что потребность в диагностике синегнойной инфекции очевидна, и на протяжении десятилетий разработано большое разнообразие питательных сред, в том числе и для выявления возбудителей сапа и мелиоидоза, существующие бактериологические параметры схем, методов выделения, идентификации и индикации представителей рода *Pseudomonas* несовершенны.

Результаты и обсуждение

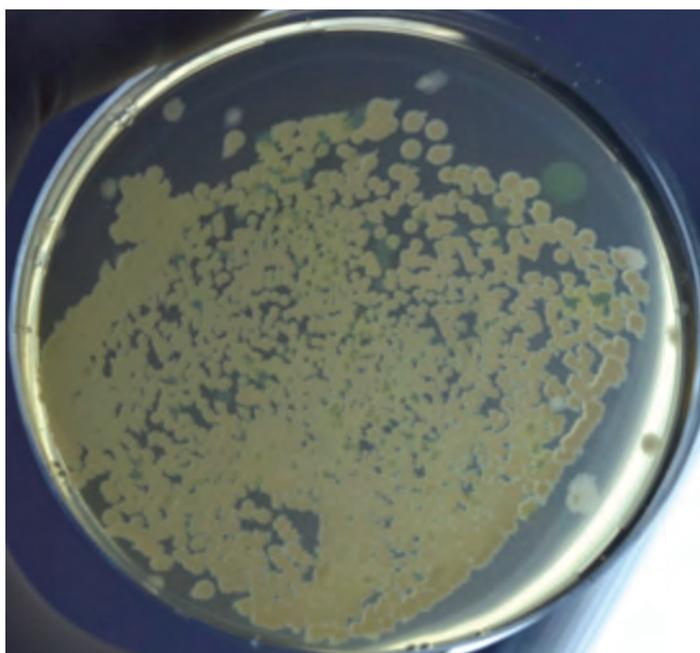
ФБУН ГНЦ ПМБ выпускает различные питательные среды для накопления и идентификации псевдомонад: Питательная среда №8 ГРМ – для выращивания *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*, ГРМ-агар – для культивирования различных неприхотливых микроорганизмов, в том числе и синегнойной палочки, Питательная среда №9 ГРМ – для выявления пигмента пиоцианина, Цетримидный агар – для селективного выделения псевдомонад [9].

Для удовлетворения потребностей отечественных бактериологов в качественных питательных средах, в том числе и для селективного выделения псевдомонад, принято решение о разработке и производстве модифицированного ЦПХ-агара, сухого.

С этой целью прежде всего было изучено влияние фенозан-кислоты (3-(3,5-дитретбутил-4-оксифенил) пропионовая кислота) на рост псевдомонад и ассоциативных микроорганизмов, а кроме того, возможность замены дорогостоящей фенозан-кислоты (и ее производных) на более дешевый – бутилгидрокситолуол (2,6-Бис(1,1-диметилэтил)-4-метилфенол) (БГТ). Оба химических вещества являются мощными антиоксидантами, препятствующими окислению жирорастворимых витаминов А и Е, помогают вырабатывать больше необходимой клеткам энергии, в результате чего происходит естественная циркуляция питательных веществ, что способствует накоплению биомассы.

Реакциями окисления называются процессы образования свободных радикалов вследствие потери одного или не-

Таблица 1. Характер роста тест-штаммов микроорганизмов					
№ п/п	Наименование тест-штамма	Разведение	Антиоксиданты (г/л)		
			без антиоксидантов	фенозан-кислота КОЕ, диаметр мм	бутилгидрокситолуол (БГТ)
1	<i>P. aeruginosa</i> 453	10 ⁻⁷	22 4,0–8,0 Колонии плоские слизистые в R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента. Среда контаминирована.	17 4,0–8,0 Колонии плоские слизистые в R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента. Среда контаминирована.	22 4,0–8,0 Колонии плоские слизистые в SR-форме с образованием лимонно-желтого пигмента. Нет контаминации среды
2	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 Париж	10 ⁻⁷	Среда контаминирована. Обильный рост посторонней микрофлоры	13 5,0–8,0 Колонии плоские слизистые в R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента. Среда контаминирована. Обильный рост посторонней микрофлоры	12 5,0–8,0 Колонии плоские слизистые в SR-форме с образованием лимонно-желтого пигмента. Нет контаминации среды
3	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 (NCTC 12924)	10 ⁻⁷	5 4,0–8,0 Среда контаминирована. Обильный рост посторонней микрофлоры	8 5,0–10,0 Колонии плоские слизистые в R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента. Среда контаминирована. Обильный рост посторонней микрофлоры	9 4,0–9,0 Колонии плоские слизистые в SR-форме колоний, с образованием лимонно-желтого пигмента. Нет контаминации среды
4	<i>P. aeruginosa</i> 27/99	10 ⁻⁷	14 4,0–8,0 Среда контаминирована. Обильный рост посторонней микрофлоры	15 4,0–8,0 Колонии плоские слизистые в R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента. Среда контаминирована	16 4,0–8,0 Колонии плоские слизистые в R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента. Нет контаминации среды
5	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	10 ⁻⁷	Среда контаминирована. Сплошной рост посторонней микрофлоры	25 1,6–2,2 Колонии круглые, выпуклые с образованием лимонно-желтого пигмента. Среда контаминирована.	26 1,6–2,2 Колонии круглые, выпуклые с образованием лимонно-желтого пигмента. Нет контаминации среды
6	<i>S. aureus</i> Wood-46 (ATCC 10832)	10 ⁻¹	Сплошной рост, пророст в толще агарового слоя	Сплошной рост, пророст в толще агарового слоя	Сплошной рост, нет пророста в толще агарового слоя
7	<i>P. mirabilis</i> 3177	10 ⁻³	Сплошной рост, роение, пророст в толще агарового слоя	Сплошной рост, роение, пророст в толще агарового слоя	Сплошной рост, роение, нет пророста в толще агарового слоя
8	<i>E. coli</i> 3912/41 (O55:K59)	10 ⁻³	Сплошной рост, пророст в толще агарового слоя	Сплошной рост, пророст в толще агарового слоя	Сплошной рост, нет пророста в толще агарового слоя

Рис. 1. Рост *P. aeruginosa* 27/99 на среде без антиоксидантов.Рис. 2. Рост *P. aeruginosa* 27/99 на среде с фенозан-кислотой.

скольких электронов, промежуточных продуктов обмена веществ при росте микроорганизмов. Свободные радикалы собираются в клеточных мембранах (липидное перокисление), клеточные липиды подвергаются окислению и повреждаются. Из-за этого клеточные мембраны становятся хрупкими и легко проницаемыми. Они плохо удерживают содержимое клетки, что приводит к ее гибели.

Антиоксиданты (фенозан и БГТ) – это доноры электронов. Они прекращают цепную окислительную реакцию, отдавая свободным радикалам свои собственные электроны, но при этом не становятся свободными радикалами. Антиок-

сиданты – это механизм защиты клеток от частиц активного кислорода [10].

Фенозан-кислота и БГТ – гидрофобные (растворимые в липидах/жирах) антиоксиданты, способные защищать клеточные мембраны от перекисного окисления липидов. Фенозан-кислота является не только антиоксидантом, но в малых дозах способна активировать протеинкиназы, альдолазу, лактатдегидрогеназу, а следовательно, выступать в роли биостимулятора.

Задачей исследования на первом этапе стала не только альтернативная частичная замена фенозан-кислоты на БГТ,

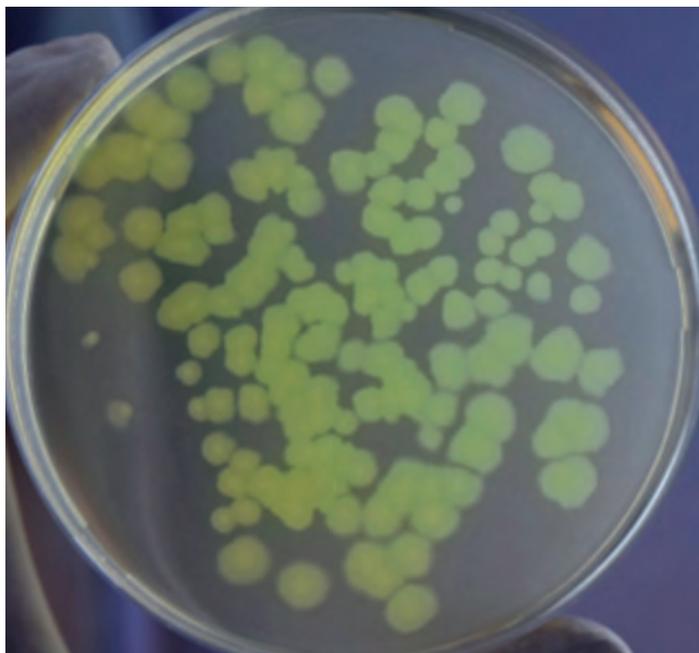


Рис. 3. Рост *P. aeruginosa* 27/99 на среде с бутилгидрокситолуолом.

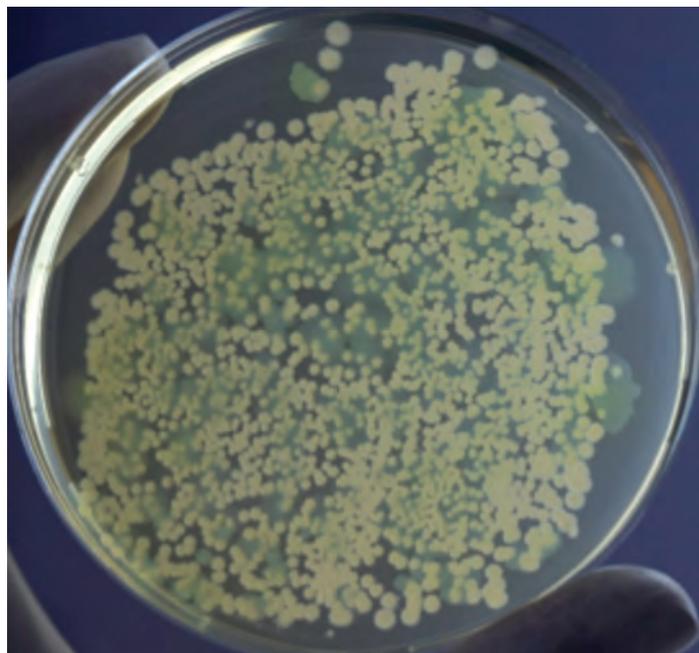


Рис. 4. Рост *P. aeruginosa* ATCC 9027 (NCTC 12924) на среде без антиоксидантов.



Рис. 5. Рост *P. aeruginosa* ATCC 9027 (NCTC 12924) на среде с фенозан-кислотой.

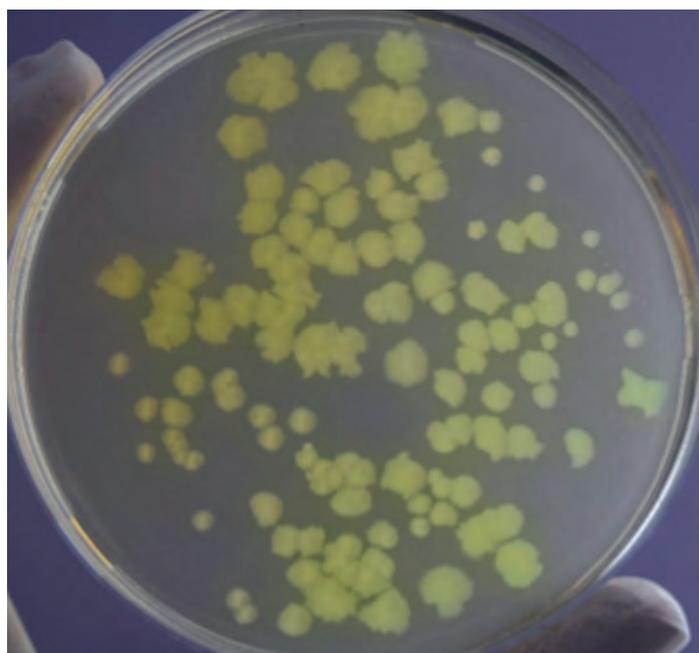


Рис. 6. Рост *P. aeruginosa* ATCC 9027 (NCTC 12924) на среде с бутилгидрокситолуолом.

но и оценка их роли в качестве биостимуляторов роста псевдомонад на ЦПХ-агаре [11].

Действие каждого из антиоксидантов и их суммарной комбинации в концентрации 0,1 г/л изучали на модели ЦПХ-агара без добавления селективного агента – N-цетилпиридиния хлорида (N-ЦПХ).

Разработанные в ФБУН ГНЦ ПМБ питательные среды для выявления псевдомонад в качестве белковой основы содержат панкреатические гидролизаты казеина, рыбной кормовой муки, пептон мясной. Многолетней практикой установлено, что данные источники азотистого питания

в полной мере обеспечивают питательные потребности микроорганизмов.

В качестве белковой основы ЦПХ-агара использовали панкреатический гидролизат рыбной муки (ПГРМ). Кроме того, среда содержала сернокислые магний и калий – 2,4 и 7,6 г/л соответственно, калий фосфорнокислый однозамещенный и калий фосфорнокислый двухзамещенный по 1,0 г/л, натрий углекислый для стабилизации pH среды при росте микроорганизмов, агар бактериологический. ЦПХ-агар стерилизуется кипячением в течение 1–2 мин до полного расплавления агара.

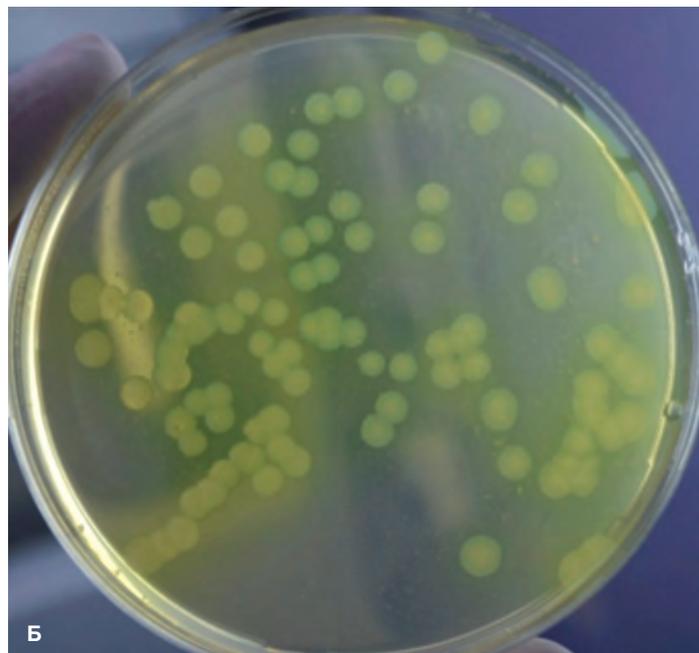
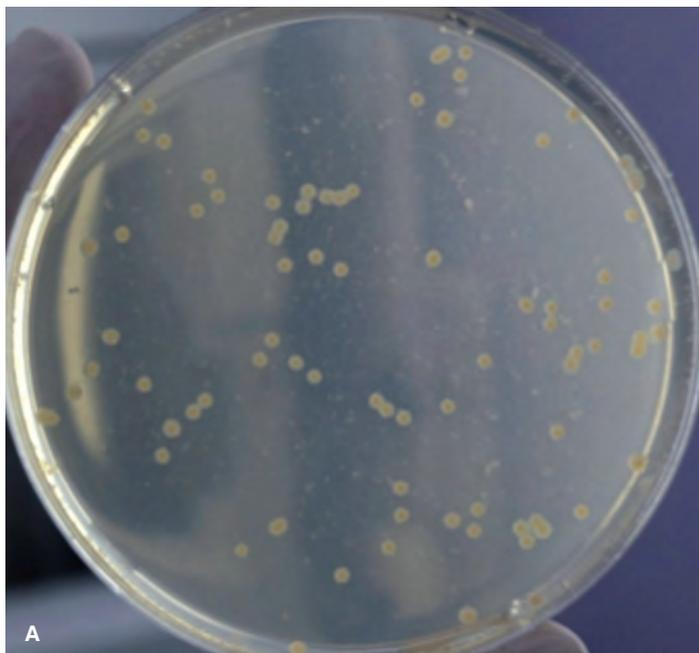


Рис. 7. Рост *P. aeruginosa* 27/99 на контрольном ЦПХ-агаре и экспериментальном ЦПХ-агаре с фенозан-кислотой и бутилгидрокси-толуолом. А – контрольный ЦПХ-агар; Б – экспериментальный ЦПХ-агар.

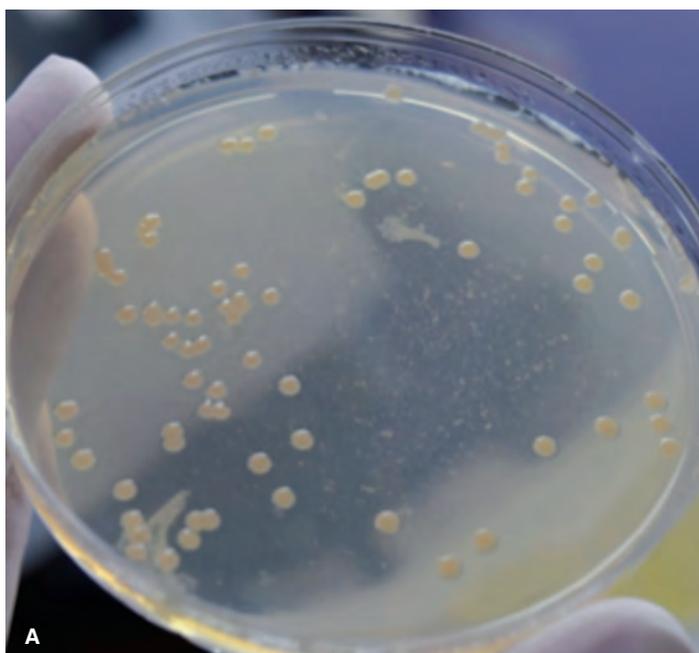


Рис. 8. Рост *P. aeruginosa* ATCC 10145 на контрольном ЦПХ-агаре и экспериментальном ЦПХ-агаре с фенозан-кислотой и бутилгидрокси-толуолом. А – контрольный ЦПХ-агар; Б – экспериментальный ЦПХ-агар.

Для оценки ростовых свойств использовали тест-штаммы культур микроорганизмов из разведений 10^{-7} и 10^{-6} для псевдомонад и 10^{-1} , 10^{-3} – для возможных сопутствующих микроорганизмов.

Для контроля посевной дозы тест-штаммов микроорганизмов использовали неселективную питательную среду общего назначения – ГРМ-агар. Так как экспериментальные варианты среды не содержали ингибиторов, посева инкубировали 24 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Результаты исследования влияния антиоксидантов на рост псевдомонад из разведения 10^{-7} представлены в таблице 1, и рост псевдомонад из разведения 10^{-6} – на рис. 1–6.

Следует заметить, что мягкая стерилизация образцов питательной среды и отсутствие ингибиторов не могут обеспечить полную стерильность препаратов, а следовательно,

вероятен пророст посторонней микрофлоры в процессе инкубирования посевов.

В результате проведенных исследований на питательных средах с использованием БГТ отмечена более выраженная селективность среды в отношении псевдомонад, где после инкубации посевов тест-штаммов псевдомонад из разведения 10^{-7} и 10^{-6} полностью отсутствовал рост посторонних микроорганизмов, в то время как на средах с фенозан-кислотой и не содержащей БГТ наблюдался пророст микроорганизмов как в толще, так и на поверхности агаровой пластины среды. В отношении роста возможных ассоциантов при посевной дозе 10^6 и 10^8 кл./мл и в отсутствие в составе среды основного ингибитора – N-цетилпиридиния хлорида ингибирующий эффект слабо выражен.

Таблица 2. Биологические показатели качества ЦПХ агара

№ п/п	Наименование тест-штаммов	Разведение	ЦПХ-агар			Контроль. Питательная среда для выделения синегнойной палочки (ЦПХ агар) С Мк 020518 Дата изг. 05.2018 Годен до 05.2020 ФГУП «НПО Микроген»
			На основе ПГРМ фенозан-кислота – 0,1 г/л	На основе ПГРМ бутилгидрокситолуол – 0,1 г/л	На основе ПГРМ фенозан-кислота – 0,025 г/л. Бутилгидрокситолуол – 0,075 г/л	
1	<i>P. aeruginosa</i> 453	10^{-7}	23 6,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	27 5,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в SR и R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	21 5,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в SR- и R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	16 2,0–2,5 Колонии плоские, в S-форме без образования пигмента
2	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 Париж	10^{-7}	18 6,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	10 5,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	13 5,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	17 2,0–2,5 Колонии плоские, в S-форме без образования пигмента
3	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 (NCTC 12924)	10^{-7}	12 1,8–2,0 Колонии круглые, слизистые в S- и SR-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	5 1,8–2,0 Колонии круглые, слизистые в S- и SR-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	20 1,8–2,0 Колонии круглые, слизистые в S- и SR-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	4 1,6–1,8 Колонии круглые, выпуклые в S-форме без образования пигмента
4	<i>P. aeruginosa</i> 27/99	10^{-7}	27 6,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в SR- и R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	21 6,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в SR- и R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	16 6,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в SR- и R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	11 1,8–2,0 Колонии круглые, выпуклые в S-форме без образования пигмента
5	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	10^{-7}	21 6,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в SR-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	12 6,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в SR- и R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	17 6,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в SR- и R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	11 2,0–2,5 Колонии круглые, выпуклые в S-форме без образования пигмента
6	<i>S. aureus</i> Wood-46 (ATCC 10832)	10^{-1}	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
7	<i>S. aureus</i> ATCC 6538-P (FDA 209-P)	10^{-1}	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
8	<i>P. mirabilis</i> 3177	10^{-3}	Нет роста	Нет роста	Нет роста	320
9	<i>P. vulgaris</i> HX 19 222	10^{-3}	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
10	<i>E. coli</i> 3912/41 (O55:K59)	10^{-3}	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
11	<i>E. coli</i> ATCC25922	10^{-3}	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
12	<i>S. typhimurium</i> 79	10^{-3}	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Сплошной рост
13	<i>K. pneumoniae</i> 3534/51	10^{-3}	Нет роста	Нет роста	Нет роста	180

Отмечено, что исследуемые антиоксиданты в составе среды проявляют свойства биостимуляторов, повышая на фоне ингибиции микробов-ассоциантов чувствительность среды, а следовательно, высеваемость псевдомонад.

Таким образом, в составе ЦПХ-агара возможна полная или частичная замена фенозан-кислоты на бутилгидрокситолуол. БГТ – это производное фенола, пищевая добавка (E321), которая схожа с витамином Е. Обладает мощными антиокислительными свойствами, остается стабильной при высоких температурах и значительно дешевле фенозан-кислоты.

На втором этапе исследования был отработан качественный и количественный состав ЦПХ-агара на основе ПГРМ с N-цетилпиридинием хлористым в качестве ингибитора сопутствующих микроорганизмов. Результатом стал выбор оптимального состава питательной среды для селективного выделения представителей рода *Pseudomonas* при проведении бактериологических анализов.

В отличие от коммерческого аналога, в ЦПХ-агаре, разработанном в ФБУН ГНЦ ПМБ, произведена частичная замена фенозан-кислоты на БГТ без потери показателя специфической активности среды, дифференцирующих (пигментообразование) и ингибирующих свойств.

По результатам проведенных исследований составлена пропись питательной среды для выделения псевдомонад, включающая в качестве азотистого питания панкреатический гидролизат рыбной муки (ПГРМ), сернокислые магний и калий – 2,4 и 7,6 г/л соответственно, калий фосфорнокислый однозамещенный и калий фосфорнокислый двузамещенный по 1,0 г/л, фенозан-кислоту – 0,025 г/л, бутилгидрокситолуол – 0,075 г/л, N-цетилпиридиний хлористый – 0,2 г/л, натрий углекислый – $0,2 \pm 0,05$ г/л, агар бактериологический – (9 ± 2) г/л.

С целью подтверждения обоснованности частичной замены в составе ЦПХ-агара фенозан-кислоты в таблице 2 представлены сравнительные результаты оценки по биологическим показателям качества сред для выявления псевдомонад с использованием фенозан-кислоты, БГТ и комплекса этих компонентов в сравнении с коммерческим ЦПХ-агаром производства ФГУП «НПО Микроген» через 48 ч инкубации посевов при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Сравнительный рост псевдомонад из разведения 10^{-6} на контрольном и разработанном на основе ПГРМ ЦПХ-агаре с использованием комплекса фенозан-кислоты и БГТ через 24 ч инкубации посевов при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ представлен на рис. 7 и 8.

Заключение

Результаты сравнительной оценки специфической активности разработанного ЦПХ-агара доказали обоснованность частичной замены фенозан-кислоты на БГТ. Контрольная питательная среда для выделения синегнойной палочки (ЦПХ агар) производства ФГУП «НПО Микроген» обладает более низкой чувствительностью в отношении псевдомонад и менее выраженным ингибирующим эффектом в отношении сопутствующих микроорганизмов, так, на среде наблюдался рост *S. typhimurium* 79, *K. pneumoniae* 3534/51 и *P. mirabilis* 3177.

Совокупность компонентов, входящих в состав среды ЦПХ-агара ФБУН ГНЦ ПМБ, обеспечивает питательные потребности для роста псевдомонад с образованием пигментов. N-цетилпиридиний хлористый в предложенной концентрации 0,2 г/л (в среде прототипе – 0,3 г/л) подавляет рост возможных бактерий-ассоциантов и при этом не влияет на чувствительность среды и способность псевдомонад к пигментообразованию. Комплекс антиоксидантов (фенозан-кислота и БГТ) предотвращает окисление жирорастворимых витаминов А и Е, помогает вырабатывать больше необходимой клеткам энергии, способствует накоплению биомассы. При изучении селективных свойств среды без добавления ЦПХ и мягкой стерилизации кипячением отмечено, что на среде с комплексом антиоксидантов, в отличие от среды только с фенозаном, полностью подавляется возможный поверхностный и глубинный пророст микрофлоры, присутствующей в сырье.

Следует отметить, что снижение концентрации ингибирующих компонентов (ЦПХ, фенозан-кислоты и БГТ) в разработанном ЦПХ-агаре позволяет снизить себестоимость среды при ее производстве без ухудшения качества препарата.

Экспериментально установлено, что разработанный ЦПХ-агар обладает высокой чувствительностью в отношении псевдомонад, а следовательно, высеваемостью при бактериологических исследованиях. Отличительной особенностью разработанного ЦПХ-агара от среды сравнения является стабильность пигментообразования псевдомонад и значительная ингибиция микробов-ассоциантов.

Литература

1. Грамотрицательные аэробы. Род Псевдомонады [Электронный ресурс]. Доступно по: <https://studfiles.net/preview/1839332/page:8>
2. ГОСТ 10444.15-94. Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.
3. ГОСТ Р 54755-2011. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*.
4. Государственная фармакопея Российской Федерации ГФ XIV 2018; 1: 1128-1200.
5. Методические рекомендации. Выделение и идентификация штаммов синегнойной палочки из клинического материала. 1984, с. 1-18.
6. Методические рекомендации. Обнаружение и идентификация *Pseudomonas aeruginosa* в объектах окружающей среды (пищевых продуктах, воде, сточных жидкостях). 1984, с. 1-15.
7. Васильев ДА, Щербаков АА, Карпунина ЛВ, Золотухин СН. Учебно-методическое пособие. Методы общей бактериологии. Ульяновск, 2013, с. 8-18. УДК 619:616.
8. Приказ №535. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. 1985, с. 82-8.
9. Шепелин АП, Сергеева АБ, Полосенко ОВ. Определение специфической активности питательных сред для *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериология. 2017;2(1):54-60. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-54-60
10. Антиоксиданты – вся основная информация [Электронный ресурс]. Доступно по: <https://fitfan.ru/nutrition/10326-antioksidanty-vsja-osnovnaja-informacija.html>
11. Трещенкова ЮА, Голощанов АН, Бурлакова ЕБ. Влияние низких доз фенозана на лактатдегидрогеназу и микровязкость микросомальных мембран клеток мозга мышей. Радиационная биология. Радиозоология. 2003;43:320-2.

References

1. Gram-negative aerobes. Genus *Pseudomonas* [Internet]. Available at: <https://studfiles.net/preview/1839332/page:8> (In Russian).
2. GOST 10444.15-94. Food. Methods for determining the number of mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms. (In Russian).
3. GOST R 54755-2011. Food. Methods of detection and determination of the number of bacteria species *Pseudomonas aeruginosa*. (In Russian).
4. State Pharmacopoeia of the Russian Federation GF XIV 2018; 1: 1128-1200. (In Russian).
5. Methodical recommendation. Isolation and identification of *Pseudomonas aeruginosa* strains from clinical material. 1984, p. 1-18. (In Russian).
6. Methodical recommendation. Detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in environmental objects (food, water, waste liquids). 1984, p. 1-15. (In Russian).
7. Vasil'ev DA, Shcherbakov AA, Karpunina LV, Zolotukhin SN. Metody obshchei bakteriologii [Methods of general bacteriology]. Ulyanovsk, 2013, p. 8-18. UDK 619:616. (In Russian).
8. Order No. 535. On the unification of microbiological (bacteriological) research methods used in clinical diagnostic laboratories of medical institutions. 1985, pp. 82-8. (In Russian).
9. Shepelin AP, Sergeeva AB, Polosenko OV. Determination of nutrient medium specific activity for *Pseudomonas aeruginosa*. *Bacteriology*. 2017;2(1):54-60. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-54-60 (In Russian).
10. Antioxidants – all basic information [Internet]. Available at: <https://fitfan.ru/nutrition/10326-antioksidanty-vsja-osnovnaja-informacija.html> (In Russian).
11. Treshchenkova YuA, Goloshchapov AN, Burlakova EB. Effect of Low Doses of Phenozan on Lactate Dehydrogenase and Microviscosity of Microsomal Membranes of Brain Cells. *Radiation biology. Radioecology*. 2003;43:320-2. (In Russian).

Информация об авторах:

Марчихина Ирина Ивановна, заведующий 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, заведующий 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

Полосенко Ольга Владимовна, 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

Information about authors:

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

Olga V. Polosenko, PhD (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: 142279 Obolensk, Serpukhov District, Moscow Region, Russia
Phone: (4967) 36-0017
E-mail: polosenko@obolensk.org

НОВОСТИ НАУКИ

Спусковой крючок для аутофагии может помочь в устранении патогенных инфекций

Chaudhary et al. показали, что белки наружных мембран с третичной структурой b-ствола от грамотрицательных бактерий или митохондрий распознаются специфическими рецепторами на макрофагах и эпителиальных клетках. Добавление белков наружной мембраны к макрофагам мыши вызывало аутофагию и позволило мышам успешно избавиться от инфекции *Salmonella typhimurium*. Таким образом, иммунные ответы, активируемые белками наружных мембран, могут способствовать очистке от патогенов или аутоиммунных заболеваний.

β-Barrel outer membrane proteins suppress mTORC2 activation and induce autophagic responses.
Chaudhary A, Kamischke C, Leite M, Altura MA, Kinman L, Kulasekara H, et al.
Sci Signal. 2018 Nov 27;11(558). pii: eaat7493. DOI: 10.1126/scisignal.aat7493.

Еще одно правило N-конца

Белки, которые выходят из рибосомы, несут N-концевой остаток метионина (Met). У бактерий Met формируется до начала трансляции, тогда как у эукариот большинство зарождающихся белков, по-видимому, начинается с немодифицированного Met. Обнаружено на дрожжах, что N-концевое формирование эукариотических белков выявляется даже в нормальных условиях и значительно увеличивается при специфических стрессах, которые вызывают сохранение в цитоплазме некоторой части Fmt1-формилтрансферазы. Было обнаружено, что для удержания этого обычно митохондриального белка требуется Gcn2 киназа. Кроме того, было показано, что убиквитинлигаза Psh1 нацелена на N-концевые формилированные эукариотические белки для протеосом-зависимой деградации с помощью так называемого пути правила fMet/N-end.

Science Magazine – November 30, 2018, p. 1019

Особенности сезонной циркуляции *Vibrio cholerae* в поверхностных водоемах г. Ростова-на-Дону

Е.М.Курбатова, Е.А.Меньшикова, И.В.Архангельская,
Д.И.Левченко, В.Д.Кругликов, С.В.Титова, А.В.Миронова

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

В феврале 2018 г. в Москве состоялась презентация научной монографии «Климат Ростовской области: вчера, сегодня, завтра». Согласно анализу данных, приведенных в докладе, Ростовская область почти сравнялась с субтропиками, особенно юг области. Пока наш регион отстает по температурам: в субтропиках среднегодовая температура +11°C, а в Ростовской области – +9,95°C. Такое изменение климата может оказать благоприятный эффект на развитие патогенной вибриофлоры. Целью работы явилось изучение влияния климатических изменений на циркуляцию *Vibrio cholerae* в поверхностных водоемах г. Ростова-на-Дону. В работе использовали данные мониторинговых исследований проб воды в двух стационарных точках г. Ростова-на-Дону: р. Дон, правый берег (Державинский спуск) и р. Темерник (Ботанический сад, у моста) с мая по сентябрь включительно в период с 2013 по 2017 гг. В результате ретроспективного анализа за пятилетний период в р. Дон установлено увеличение колебаний среднемесячных температур в августе–сентябре от 1,1°C в 2013 г. до 1,4°C в 2017 г., что привело к повышению процента выделения штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 в обоих водоемах. Таким образом, в г. Ростове-на-Дону наблюдается тенденция к повышению среднемесячной температуры (август–сентябрь) поверхностных водоемов рек Дон и Темерник. На основании проведенного ретроспективного анализа выявлена связь между повышением среднемесячной температуры воды поверхностных водоемов и процентом выделения штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139.

Ключевые слова: изменение климата, ретроспективный анализ, температура воды, *Vibrio cholerae*

Для цитирования: Курбатова Е.М., Меньшикова Е.А., Архангельская И.В., Левченко Д.И., Кругликов В.Д., Титова С.В., Миронова А.В. Особенности сезонной циркуляции *Vibrio cholerae* в поверхностных водоемах г. Ростова-на-Дону. Бактериология. 2019; 4(2): 21–26. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-21-26

Features of seasonal circulation of *Vibrio cholerae* in surface water bodies of Rostov-on-Don

Е.М.Kurbatova, Е.А.Menshikova, I.V.Arkhangel'skaya, D.I.Levchenko, V.D.Kruglikov, S.V.Titova, A.V.Mironova

Rostov-on-Don Antiplague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation

In February 2018 in Moscow, a presentation of a scientific monograph “The Climate of the Rostov Region: Yesterday, Today, Tomorrow” was held. According to the analysis of the data given in the report, the Rostov region is almost equal to the subtropics, especially the south of the region. While our region is lagging behind in temperature: in the subtropics the annual is +11°C, in the Rostov region it is +9.95°C, such climate change can have a favorable effect on the development of pathogenic vibrioflora. The aim of the work was to study the influence of climate change on the circulation of *V. cholerae* in surface water bodies of the city of Rostov-on-Don. The data from monitoring studies of water samples in two stationary points of the city of Rostov-on-Don were used: p. Don, right bank (Derzhavinsky descent) and r. Temernik (Botanical Garden, near the bridge) in places of discharge of emergency drains and unorganized water use, from May to September inclusive from 2013 to 2017. As a result of a retrospective analysis for a five-year period (from 2013 to 2017) in the r. Don found an increase in fluctuations in average monthly temperatures in August–September from 1.1°C in 2013 to 1.4°C in 2017, which led to an increase in the percentage of isolation of strains of *V. cholerae* nonO1/nonO139 in both reservoirs in Rostov-on-Don. Thus, in Rostov-on-Don, there is a tendency to increase in the average monthly temperature (August–September) of the surface water bodies of the Don and Temernik rivers. Based on a retrospective analysis, a relationship was found between the increase in the average monthly water temperature of surface water bodies and the percentage release of strains of *V. cholerae* nonO1/nonO139.

Keywords: climate change, retrospective analysis, water temperature, *Vibrio cholerae*

For citation: Kurbatova E.M., Menshikova E.A., Arkhangel'skaya I.V., Levchenko D.I., Kruglikov V.D., Titova S.V., Mironova A.V. Features of seasonal circulation of *Vibrio cholerae* in surface water bodies of Rostov-on-Don. Bacteriology. 2019; 4(2): 21–26. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-21-26

Для корреспонденции:

Курбатова Екатерина Михайловна, научный сотрудник группы экологии холерных вибрионов лаборатории микробиологии холеры ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

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

Телефон: (863) 240-9108

E-mail: super.monika2007@yandex.ru

Статья поступила 21.03.2019 г., принята к печати 27.06.2019 г.

For correspondence:

Ekaterina M. Kurbatova, researcher of the group of ecology of *V. cholerae* microbiology laboratory of Rostov-on-Don Antiplague Institute of Rospotrebnadzor

Address: 117/40 M. Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation

Phone: (863) 240-9108

E-mail: super.monika2007@yandex.ru

The article was received 21.03.2019, accepted for publication 27.06.2019

В настоящее время становится все более очевидным, что всемирный климат меняется [1–3]. Глобальное изменение климата – одно из беспрецедентных крупномасштабных экологических явлений, приводящее в различных районах земного шара к нарушению водного режима пресноводных водоемов, катастрофическим наводнениям, увеличению количества ураганов и цунами, локальному изменению наземных и водных экосистем [4–6]. Межправительственной группой по климату отмечено увеличение средней температуры над сушей и поверхностью океана на 0,85°C (0,65–1,06) за период с 1880 по 2012 г., а к концу XXI в. (2081–2100 гг.) глобальная температура повысится на 1,5°C (относительно 1850 г.), что приведет к повышению уровня моря на 1 мм в год в последующие десятилетия [3, 7, 8]. Правительство Российской Федерации обратило внимание на проблемы климата, подписав в 2011 г. Климатическую Доктрину, в которой указывается, что в будущем изменение климата может привести к необратимым последствиям. Согласно докладу «Глобальный климат и почвенный покров России», постепенное потепление характерно для всей планеты, однако в России в течение всего XXI в. этот процесс будет проходить интенсивнее [9, 10].

Ростовская область относится к территориям I типа по эпидпроявлениям холеры, что создает угрозу возникновения вспышек заболеваний, связанных, в том числе, с водным путем передачи в случае заноса инфекции [11]. В феврале 2018 г. в Москве состоялась презентация научной монографии «Климат Ростовской области: вчера, сегодня, завтра», опубликованной еще в 2006 г. Согласно данным, приведенным в докладе, Ростовская область почти сравнялась с субтропиками, особенно юг области. Пока наш регион отстает по температурам: в субтропиках годовая температура +11°C, в Ростовской области – +9,95°C [1]. Такое изменение климата может оказать благоприятный эффект на развитие патогенной вибриофлоры. В период с 2003 по 2014 гг. проводилось исследование водных объектов окружающей среды на холеру, в результате которого было изолировано 89 культур *V. cholerae* O1, три из которых токсигенные, на фоне ежегодного выделения *V. cholerae* nonO1/nonO139. При анализе динамики выделения культур с учетом их эпидемической значимости установлено завозное происхождение токсигенных культур [12]. Ранее нами была выявлена прямая связь между среднеквартальной летней температурой на территории Ростовской области и количеством штаммов *V. cholerae* [13].

Цель исследования – изучение особенности циркуляции холерных вибрионов в зависимости от сезонных изменений температуры воды рек Дон и Темерник.

Материалы и методы

В работе использовали данные мониторинговых исследований проб воды в двух стационарных точках г. Ростова-на-Дону: р. Дон (правый берег, у Державинского спуска, организованный выпуск системы сброса дренажных, ливневых и талых вод) и р. Темерник (Ботанический сад, у моста, место неорганизованного рекреационного водопользования) с мая по сентябрь включительно в период с 2013 г. по 2017 г. При исследовании 134 проб (с учетом дополнительных заборов в связи с выделением нетоксигенных штаммов) из р. Дон изолировано 85 штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 серогрупп, два нетоксигенных штамма холерных вибрионов O1 серогруппы; а из 122 проб из р. Темерник – 69 штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 и *V. cholerae* O1 с генетической характеристикой *ctx*⁺ и *ctx*⁻. Температуру воды измеряли в момент забора проб из поверхностных слоев водоема в одно и то же время (с 8 до 9 ч утра). Выделение и идентификацию холерных вибрионов проводили в соответствии с действующими нормативными документами [14]. Процент выделения *V. cholerae* определяли как отношение выделенных штаммов холерных вибрионов к общему количеству отобранных проб. Серологическое типирование *V. cholerae* nonO1/nonO139 серогрупп проводили с помощью набора сывороток диагностических холерных неO1/неO139 серогрупп моноспецифических кроличьих против типовых штаммов холерных вибрионов O2-O84 серогрупп в реакции слайд-агглютинации [14–16]. Подготовка материала для ПЦР-анализа проводилась согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». ПЦР-генотипирование исследуемых штаммов проводили по набору 14 генов-мишеней: ген RS-элемента (*rstA*); ген острова патогенности VPI – структурной единицы токсин-корегулируемых пилей *tcpA*; гены острова патогенности VPI-2 (*int* – «верхний краевой» фрагмент острова, ген нейраминидазы *nanH* и «нижний краевой» фрагмент *vce*); гены цитотоксического кластера RTX (*rtxA* – 5'-концевой участок гена высокомолекулярного цитотоксина; последовательность, кодирующая его ACD-домен, продукт которого вызывает деполиме-

Таблица 1. Река Дон, правый берег, Державинский спуск

№ п/п	Месяц Год	Май			Июнь			Июль			Август			Сентябрь		
		средняя t° С воды	% высеваемости <i>V. cholerae</i> nonO1/O139	% высеваемости <i>V. cholerae</i> O1	средняя t° С воды	% высеваемости <i>V. cholerae</i> nonO1/O139	% высеваемости <i>V. cholerae</i> O1	средняя t° С воды	% высеваемости <i>V. cholerae</i> nonO1/O139	% высеваемости <i>V. cholerae</i> O1	средняя t° С воды	% высеваемости <i>V. cholerae</i> nonO1/O139	% высеваемости <i>V. cholerae</i> O1	средняя t° С воды	% высеваемости <i>V. cholerae</i> nonO1/O139	% высеваемости <i>V. cholerae</i> O1
1	2013	19,7	0	0	22,6	50	0	25,6	50	25	23,2	75	0	17,6	50	0
2	2014	19,5	0	0	22	100	0	22,5	100	0	26	100	0	18,4	60	0
3	2015	16	0	0	23,3	60	0	24,1	50	14,3	23	100	0	21	50	0
4	2016	19,7	66	0	25,2	80	0	26	83	0	24,5	100	0	18,8	33	0
5	2017	15	20	0	20,8	25	0	22,4	80	0	25	100	0	19,5	100	0

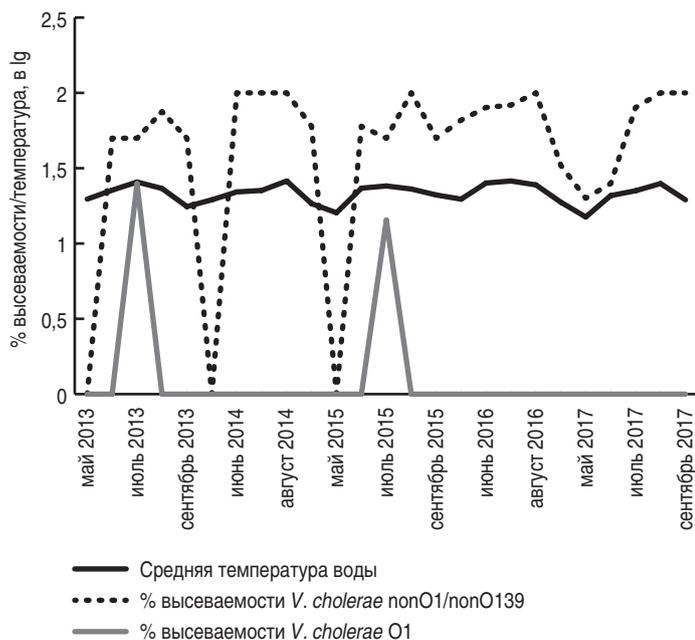


Рис. 1. Динамика выделения штаммов *V. cholerae* O1 и nonO1/nonO139 серогрупп из р. Дон, правый берег Державинский спуск с 2013 г. по 2017 г.

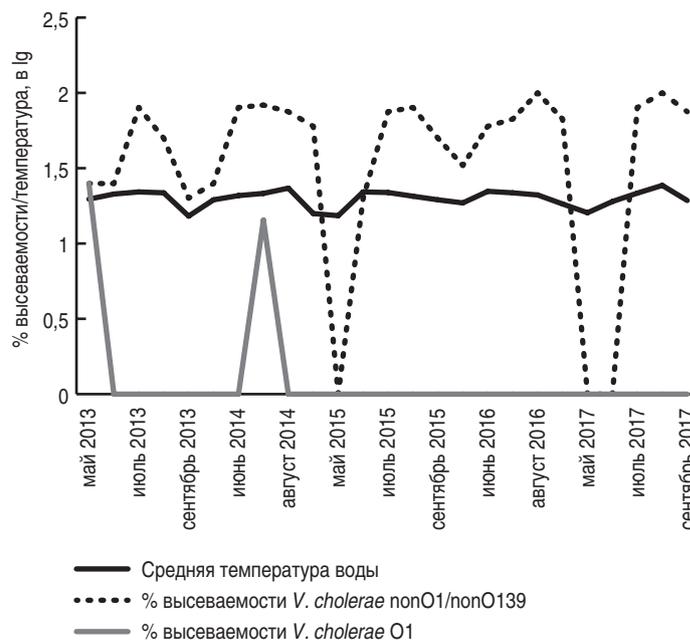


Рис. 2. Динамика выделения штаммов *V. cholerae* O1 и nonO1/nonO139 серогрупп из р. Темерник, Ботанический сад у моста с 2013 г. по 2017 г.

ризацию и ковалентное связывание актина в клетках кишечника; *rtxC* – ген предполагаемого активатора токсина RtxA); ген структурной единицы маннозочувствительных пилей адгезии *mshA*; кластеры генов контакт-зависимых систем секреции третьего типа – T3SS (*vcsN2*, *vspD*), шестого типа – T6SS (*vgrG3*), а также ее ключевого эффектора ACD-VgrG1, который является «двойником» и возможным предшественником ACD-RtxA и обладает такой же актин-связывающей активностью; ген термостабильного (*stn/sto*) токсина [17–19].

Результаты и обсуждение

В результате ретроспективного анализа за пятилетний период (с 2013 по 2017 гг.) температуры ($t^{\circ}\text{C}$) воды в р. Дон установили, что минимальная среднесезонная температура зафиксирована в 2017 г. – $20,5 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$; а максимальная в 2016 г. – $22,8 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$. Нами установлено увеличение температуры в августе 2017 г. на $1,8^{\circ}\text{C}$ по сравнению с 2013 г. (от $23,2^{\circ}\text{C}$ в 2013 г. до 25°C в 2017 г.) и сентябре на $1,9^{\circ}\text{C}$ (от $17,6^{\circ}\text{C}$ – 2013 г. до $19,5^{\circ}\text{C}$ –

2017 г.). Наибольшую среднюю температуру наблюдали в августе 2014 г. (26°C).

В этот же период в р. Темерник средняя температура в период мониторинговых исследований (май–сентябрь) была более стабильной, однако также отмечен рост температурных показателей в августе ($24,8 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$) и сентябре 2017 г. ($19,3 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$), что на $2,5^{\circ}\text{C}$ и $4,1^{\circ}\text{C}$ выше по сравнению с этим же месяцами в 2013 г. ($22,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ и $15 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$ соответственно).

При проведении ретроспективного анализа результатов исследований воды на контаминацию холерными вибрионами поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону установили, что процент выделения штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 в реке Дон в мае 2016 г. составил 66%, в 2017 г. – 20%, тогда как в 2013, 2014, 2015 гг. в мае *V. cholerae* nonO1/nonO139 не выделяли. В августе–сентябре 2017 г. процент выделения холерных вибрионов составил 100%, а в этот же период 2013 г. всего 75% (август) и 50% в сентябре (табл. 1). Аналогичную картину наблюдали в ходе мониторинга за этот же период в реке Темерник (табл. 2). Однако следует отметить, что в мае при температуре 15°C отмечено выделение

Таблица 2. Река Темерник, Ботанический сад, у моста

№ п/п	Месяц Год	Май			Июнь			Июль			Август			Сентябрь		
		средняя $t^{\circ}\text{C}$ воды	% высеваемости <i>V. cholerae</i> nonO1/O139	% высеваемости <i>V. cholerae</i> O1	средняя $t^{\circ}\text{C}$ воды	% высеваемости <i>V. cholerae</i> nonO1/O139	% высеваемости <i>V. cholerae</i> O1	средняя $t^{\circ}\text{C}$ воды	% высеваемости <i>V. cholerae</i> nonO1/O139	% высеваемости <i>V. cholerae</i> O1	средняя $t^{\circ}\text{C}$ воды	% высеваемости <i>V. cholerae</i> nonO1/O139	% высеваемости <i>V. cholerae</i> O1	средняя $t^{\circ}\text{C}$ воды	% высеваемости <i>V. cholerae</i> nonO1/O139	% высеваемости <i>V. cholerae</i> O1
1	2013	19,7	25	25	21,3	25	0	22	80	0	21,7	50	0	15,2	20	0
2	2014	19,5	25	0	20,8	80	0	21,5	83	14,3	23,3	75	0	15,8	60	0
3	2015	15,3	0	0	22	20	0	21,8	75	0	20,6	80	0	19,5	50	0
4	2016	18,6	33	0	22,2	60	0	21,7	67	0	21	100	0	18,3	67	0
5	2017	16	0	0	19	0	0	21,6	80	0	24,3	100	0	19,3	75	0

Таблица 3. ПЦР-характеристика нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1, выделенных в г. Ростове-на-Дону

№ п/п	№ штамма, год выделения, водоем	RS1,	VPI-I		VPI-2			RTX			T6SS		T3SS		<i>mshA</i>	<i>stn/sto</i>
		RS2 <i>rstA</i>	<i>tcpA</i>	<i>int</i>	<i>nan H</i>	<i>vce</i>	<i>rtxC</i>	<i>acd-rtxA</i>	<i>acd-vgrG1</i>	<i>pbd-vgrG3</i>	<i>vasK</i>	<i>vcsN2</i>	<i>vspD</i>			
1	№ 65(19430), 2013, р. Темерник	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	
2	№ 204 (19434), 2013, р. Дон	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	
3	№ 90 (19764), 2015, р. Дон	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	

V. cholerae nonO1/nonO139. В сентябре при понижении температуры до 19,5°C в реке Дон и 19,3°C в реке Темерник сохранялся высокий процент высеваемости холерных вибрионов nonO1/nonO139 серогрупп – 100% и 75% соответственно.

В ходе мониторинговых исследований поверхностных водоемов установили, что пик выделения штаммов холерных вибрионов nonO1/nonO139 серогрупп происходил в интервале температур от 22,0 ± 0,3°C до 26,0 ± 0,7°C (р. Дон) (рис. 1) и от 21,6 ± 0,5°C до 24,8 ± 1,3°C в р. Темерник (рис. 2).

Холерные вибрионы nonO1/nonO139 серогрупп известны как возбудители острых кишечных инфекций (ОКИ) [14, 20–22]. Будучи лучше приспособленными к персистенции в объектах окружающей среды (в сравнении с изолятами *V. cholerae* O1), штаммы холерных вибрионов nonO1/nonO139, даже в условиях умеренного климата, возможно, могут служить природными резервуарами генов факторов патогенности, которые могут передаваться другим холерным вибрионам [23].

Проводя сравнительный анализ полученных результатов серологической идентификации с данными 2013–2017 гг., были отмечены незначительные изменения в составе серогрупп вибрионов, циркулирующих в воде поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону, а именно: если по результатам серотипирования штаммов, выделенных в 2013 г., в г. Ростове-на-Дону повторялись штаммы O16, O53, O67, O76 серогрупп, то в 2017 г. из этих рек наряду с сохранением доминирующего положения представителей O16 и O76 серогрупп, культуры O53 и O67 серогрупп не выделялись [12, 24–26].

Следует отметить, что наряду с ежегодным выделением из воды исследуемых точек *V. cholerae* nonO1/nonO139 отмечены единичные случаи обнаружения холерных вибрионов O1 серогруппы. Так, в р. Дон в июле 2013 г. был изолирован штамм *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa *ctxAB-tcpA*- при температуре воды 25,6 ± 0,5°C, в 2015 г. из этой точки выделен штамм *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa *ctxAB-tcpA*- при температуре 24,3 ± 0,7°C. В р. Темерник в 2013 г. изолирован штамм *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa *ctxAB-tcpA*- при температуре воды 19,8 ± 0,9°C, а в 2014 г. – *V. cholerae* O1 El Tor Inaba *ctxAB+tcpA+* (температура 21,1 ± 0,3°C). Р.В.Писановым и соавт. при проведении ПЦР-генотипирования изолированных штаммов холерных вибрионов установлено, что токсигенный штамм содержал гены кластеров RS1, RS2, островов патогенности VPI-I и VPI-II, кластеров системы секреции шестого типа и ген маннозочувствительных пилей адгезии (*mshA*). Гены кластера системы секреции третьего типа и ген термостабильного токсина (*stn/sto*) не выявлены [27].

Что касается нетоксигенных штаммов холерных вибрионов, то структура их генома была более вариабельна. Все

нетоксигенные штаммы содержали гены кластера системы секреции третьего типа (T3SS). Гены кластера RS1, острова патогенности VPI-I, а также ген структурной единицы маннозочувствительных пилей адгезии (*mshA*) выявлены не были. Гены острова VPI-II, кластера RTX, системы секреции шестого типа, а также ген термостабильного токсина (*stn/sto*) были обнаружены в различных сочетаниях (табл. 3).

В.Д.Кругликовым и соавт. (2018) установлено, что нетоксигенные штаммы холерных вибрионов O1 с вышеуказанным набором генов ранее обнаруживались на данной территории, что, по нашему мнению, может свидетельствовать, с одной стороны, о персистентном потенциале нетоксигенных штаммов с таким набором генов, а с другой стороны, о благоприятных климато-географических условиях поверхностных водоемов Ростова-на-Дону [17]. Выделение холерных вибрионов O1 серогруппы различной токсигенности происходило в том же температурном диапазоне, что и холерных вибрионов nonO1/nonO139 серогрупп (от 19,8 ± 0,9°C до 25,2 ± 1,1°C) (табл. 1, 2).

Заключение

Таким образом, на основании проведенного ретроспективного анализа выявлена связь между повышением среднемесячной температуры воды поверхностных водоемов и процентом выделения штаммов *V. cholerae*. Следует отметить, что единичные случаи выделения токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 происходили в таком же температурном диапазоне, при котором были обнаружены нетоксигенные штаммы холерных вибрионов O1 и холерные вибрионы nonO1/nonO139. Приведенные нами данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения влияния температуры поверхностных водоемов на персистенцию холерных вибрионов в нашем регионе в связи с неблагоприятным прогнозом по холере в мире, возможностью заноса токсигенных и потенциально опасных штаммов из эпидемически неблагополучных стран.

Литература

1. Панов ВД, Лурье ПМ, Ларионов ЮА. Климат Ростовской области: вчера, сегодня, завтра. Ростов-на-Дону, 2006, 488 с.
2. World Health Organization. 2016.
3. Climate change 2014. Available at: [http://Inter-Governmental Panel on Climate Change \(IPCC\)](http://Inter-Governmental Panel on Climate Change (IPCC)).
4. Okeanrasters for analysis of climate and environment. Available at: <http://www.oracle.ugent.be>
5. Merrow C, Smith MJ, Silander JA. A practical guide to Maxent for modeling species, 383 distributions: what is does, and why inputs and settings matter. *Ecography*. 2013;36:1058-69.

6. Домнин СГ, Корсак МН, Короленко МИ. К оценке возможных негативных последствий влияния изменений климата на здоровье населения России. Аналитический вестник Совета Федерации ФС РФ. 2008;4(349):44-5.
7. Escobar L, Ryan SJ, Stewart-Ibarra AM, Finkelstein JL, King CA, Qiao H, Polhemus ME. A global map of suitability for coastal *Vibrio cholerae* under current and future climate conditions. *Acta Trop.* 2015 Sep;149:202-11. DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.05.028
8. Chowdhury FR, Nur Z, Hassan N, von Seidlein L, Dunachie S. Pandemics, pathogenicity and changing molecular epidemiology of cholera in the era of global warming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2017 Mar 7;16(1):10. DOI: 10.1186/s12941-017-0185-1
9. Глобальное потепление. Причины изменения глобального климата. 2011. Доступно по: <http://worldclime.ru>
10. Глобальный климат и почвенный покров России. 2018. Доступно по: <http://www.donnews.ru>.
11. СП 3.1.1.2521-09: Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации: Санитарные правила. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2009, 35 с.
12. Титова СВ, Кругликов ВД, Ежова МИ, Водопьянов АС, Архангельская ИВ, Водопьянов СО, Москвитина ЭА. Анализ динамики выделения и биологических свойств штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, изолированных из водных объектов на территории Ростовской области в 2003–2014 гг. Здоровье населения и среда обитания. 2015;2(263):39-41.
13. Левченко ДА, Кругликов ВД, Архангельская ИВ, Ежова МИ. Анализ динамики выделения штаммов холерных вибрионов из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации с 1989 по 2016 гг. с помощью авторской ГИС. Вестник Пермского университета. Серия: Биология. 2017;1:112-7.
14. Методические указания МУК 4.2.2218-07: Лабораторная диагностика холеры: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2007, 87 с.
15. Кругликов ВД, Ломов ЮМ, Авдеева ЕП, Монахова ЕВ, Ежова МИ, Архангельская ИВ, и др. Серологическое типирование и генотипическая характеристика холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп, выделенных из воды поверхностных водоемов и стоков Ростова-на-Дону в 2003–2008 гг. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2010;2:3-8.
16. Авдеева ЕП. Совершенствование метода серологической идентификации холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. 2006, 23 с.
17. Кругликов ВД, Левченко ДА, Водопьянов АС, Непомнящая НБ. ПЦР-генотипирование нетоксигенных штаммов холерных вибрионов как один из подходов их актуализации в плане эпиднадзора за холерой. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2018;2:28-35. DOI: 10.18565/epidem.2018.2.28-35
18. Левченко ДА, Кругликов ВД, Водопьянов АС, Непомнящая НБ. Патент на изобретение № 2665542 «Способ идентификации нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы с помощью ПЦР для выделения генетических детерминант» от 30.08.2018 г.
19. Левченко ДА, Кругликов ВД, Водопьянов АС, Титова СВ, Архангельская ИВ, Непомнящая НБ, Ежова МИ. ГИС: возможности анализа данных фено- и генотипирования холерных вибрионов O1 Эль Тор, изолированных из водных объектов окружающей среды на территории Российской Федерации. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016;6:19-25.
20. Dutta D, Chowdhury G, Pazhani GP, Guin S, Dutta S, Ghosh S, et al. *Vibrio cholerae* Non-O1, Non-O139 Serogroups and Cholera-like Diarrhea, Kolkata, India. *Emerg Infect Dis.* 2013 Mar;19(3):464-7. DOI: 10.3201/eid1903.121156
21. Монахова ЕВ, Архангельская ИВ. Холерные вибрионы неO1/неO139 серогрупп в этиологии острых кишечных инфекций: современная ситуация в России и в мире. Проблемы особо опасных инфекций. 2016;2:14-23. DOI: 0.21055/0370-1069-2016-2-14-23
22. Ottaviani D, Leoni F, Rocchegiani E, Santarelli S, Masini L, Di Trani V, et al. Prevalence and virulence properties of *Vibrio cholerae* non-O1 non-139 strains isolated from seafood and clinical samples in Italy. *Int J Food Microbiol.* 2009 Jun 1;132(1):47-53. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.014
23. Титова СВ, Монахова ЕВ, Архангельская ИВ, Писанов РВ, Непомнящая НБ. Природные популяции холерных вибрионов как резервуар генов факторов патогенности. Здоровье населения и среда обитания. 2016;5(278):45-7.
24. Архангельская ИВ, Ежова МИ, Кругликов ВД, Левченко ДА. Серологическая идентификация холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп, выделенных в результате мониторинга водных экосистем Ростовской области с 1999 по 2016 годы. Материалы совещания специалистов Роспотребнадзора. Вып. 30. Ростов-на-Дону, 2017, с. 89-92.
25. Смоликова ЛМ, Сомова АГ, Мединский ГМ, Воронежская ЛГ, Серовары НАГ-вибрионов, выделенные из воды открытых водоемов. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1979;23(3):306-312.
26. Авдеева ЕП, Мазрухо БЛ, Воронежская ЛГ, Цедова ЭГ, Монахова ЕВ, Михась НК, и др. Особенности циркуляции различных по происхождению холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2006;2:19-22.
27. Писанов РВ, Ежова МИ, Монахова ЕВ, Черкасов АВ, Краснов ЯМ, Водопьянов АС, и др. Особенности структуры генома токсигенного штамма *Vibrio cholerae* El Tor Инаба, выделенного в Ростове-на-Дону. Проблемы особо опасных инфекций. 2015;2:63-7.

References

1. Panov VD, Lur'e PM, Larionov YuA. Klimat Rostovskoi oblasti: vchera, segodnya, zavtra [The Climate of the Rostov Region: Yesterday, Today, Tomorrow]. Rostov-on-Don, 2006, 488 p. (In Russian).
2. World Health Organization. 2016.
3. Climate change 2014. Available at: [http://Inter-Governmental Panel on Climate Change \(IPCC\)](http://Inter-Governmental Panel on Climate Change (IPCC)).
4. Okeanrasters for analysis of climate and environment. Available at: <http://www.oracle.ugent.be>
5. Mellow C, Smith MJ, Silander JA. A practical guide to Maxent for modeling species, 383 distributions: what is does, and why inputs and settings matter. *Ecography.* 2013;36:1058-69.
6. Domnin SG, Korsak MN, Korolenko MI. K otsenke vozmozhnykh negativnykh posledstviy vliyaniya izmenenii klimata na zdorov'e naseleniya Rossii. Analiticheskii vestnik Soveta Federatsii FS RF. 2008;4(349):44-5. (In Russian).
7. Escobar L, Ryan SJ, Stewart-Ibarra AM, Finkelstein JL, King CA, Qiao H, Polhemus ME. A global map of suitability for coastal *Vibrio cholerae* under current and future climate conditions. *Acta Trop.* 2015 Sep;149:202-11. DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.05.028
8. Chowdhury FR, Nur Z, Hassan N, von Seidlein L, Dunachie S. Pandemics, pathogenicity and changing molecular epidemiology of cholera in the era of global warming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2017 Mar 7;16(1):10. DOI: 10.1186/s12941-017-0185-1
9. Global warming. Causes of global climate change. 2011. Available at: <http://worldclime.ru> (In Russian).
10. The global climate and the soil cover of Russia. 2018. Available at: <http://www.donnews.ru>.
11. СП 3.1.1.2521-09: cholera Prevention. General requirements for epidemiological surveillance of cholera in the territory of the Russian Federation: Sanitary regulation. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor; 2009, 35 p. (In Russian).

12. Titova SV, Kruglikov VD, Ezhova MI, Vodopyanov AS, Arkhangelskaya IV, Vodopyanov SO, Moskvitina EA. Analysis of isolation dynamics and biological properties of *V. cholerae* O1 el tor strains from water objects on the territory of Rostov region in 2003-2014. *Public Health and Life Environment*. 2015;2(263):39-41. (In Russian).
13. Levchenko DA, Kruglikov VD, Arkhangelskaya IV, Ezhova MI. analysis of the dynamics of *Vibrio Cholerae* strains isolation from environmental objects on the territory of the Russian Federation from 1989 to 2016 using the author's GIS. *Bulletin of Perm University. Biology*. 2017;1:112-7. (In Russian).
14. Methodical Instructions of MUK 4.2.2218-07: Laboratory diagnostics of cholera: Methodical instructions. Moscow: Federal Center of Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor; 2007, 87 p. (In Russian).
15. Kruglikov VD, Lomov YuM, Avdeeva EP, Monakhova EV, Ezhova MI, Arkhangelskaya IV, et al. Serotyping and genotypic characteristic of *Vibrio Cholerae* non-O1/non-O139 serogroups isolated from water of surface basins and sewages of Rostov on-Don city in 2003–2008. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2010;2:3-8. (In Russian).
16. Avdeeva EP. Sovershenstvovanie metoda serologicheskoi identifikatsii kholernykh vibriionov ne O1/ne O139 serograpp. Diss. 2006, 23 p. (In Russian).
17. Kruglikov VD, Levchenko DA, Vodopyanov AS, Nepomnyashchaya NB. PCR genotyping of non-toxigenic *Vibrio Cholerae* strains as one of approaches to their actualization in terms of epidemiological surveillance of cholera. *Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*. 2018;2:28-35. DOI: 10.18565/epidem.2018.2.28-35 (In Russian).
18. Levchenko DA, Kruglikov VD, Vodopyanov AS, Nepomnyashchaya NB. Patent for the invention № 2665542 "Method of identifying non-toxigenic strains of *V. cholerae* O1 serogroup by PCR for the selection of genetic determinants" 30.08.2018 (In Russian).
19. Levchenko DA, Kruglikov VD, Vodopyanov AS, Titova SV, Arkhangelskaya IV, Nepomnyashchaya NB, Ezhova MI. GIS: capabilities of data analysis of pheno- and genotyping of el tor O1 serogroup Cholera Vibrios isolated from aquatic objects of the environment in Russia Federation. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2016;6:19-25. (In Russian).
20. Dutta D, Chowdhury G, Pazhani GP, Guin S, Dutta S, Ghosh S, et al. *Vibrio cholerae* Non-O1, Non-O139 Serogroups and Cholera-like Diarrhea, Kolkata, India. *Emerg Infect Dis*. 2013 Mar;19(3):464-7. DOI: 10.3201/eid1903.121156
21. Monakhova EV, Arkhangelskaya IV. Cholera Vibrios of nonO1/nonO139 Serogroups in Etiology of Acute Intestinal Infections: Current Situation in Russia and Around the World. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;2:14-23. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-14-23 (In Russian).
22. Ottaviani D, Leoni F, Rocchegiani E, Santarelli S, Masini L, Di Trani V, et al. Prevalence and virulence properties of *Vibrio cholerae* non-O1 non-139 strains isolated from seafood and clinical samples in Italy. *Int J Food Microbiol*. 2009 Jun 1;132(1):47-53. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.014
23. Titova SV, Monakhova EV, Arkhangelskaya IV, Pisanov RV, Nepomnyashchaya NB. Natural populations of *vibrio cholerae* as a reservoir of virulence-associated genes. *Public Health and Life Environment*. 2016;5(278):45-7. (In Russian).
24. Arkhangelskaya IV, Ezhova MI, Kruglikov VD, Levchenko DA. Serological identification of *V. cholerae* nonO1/nonO139 serogroups identified in the result of monitoring aquatic ecosystems of the Rostov region from 1999 to 2016. *Proceedings of the meeting of specialists of Rospotrebnadzor*. Issue 30. Rostov-on-Don, 2017, pp. 89-92. (In Russian).
25. Smolikova LM, Somova AG, Medinskii GM, Voronezhskaya LG. Serovary NAG-vibriionov, vydelenyie iz vody otkrytykh vodoemov. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1979;23(3):306-312. (In Russian).
26. Avdeyeva YeP, Mazrukho BL, Voronezhskaya LG, Tsedova EG, Monakhova YeV, Mikhas NK, et al. The specific features of originally different *Vibrio cholerae* non O1/non O139 serogroups. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2006;2:19-22. (In Russian).
27. Pisanov RV, Ezhova MI, Monakhova EV, Cherkasov AV, Krasnov YaM, Vodopyanov AS, et al. Peculiarities of Genome Structure of Toxigenic *Vibrio cholerae* El Tor Inaba Strain, Isolated from a Surface Water Body in the Territory of Rostov-on-Don in 2014. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2015;2:63-7. (In Russian).

Информация об авторах:

Меньшикова Елена Аркадьевна, кандидат биологических наук, руководитель группы экологии холерных вибрионов лаборатории микробиологии холеры ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
 Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40
 Телефон: (863) 240-9108
 E-mail: super.monika2007@yandex.ru

Архангельская Ирина Викторовна, научный сотрудник лаборатории микробиологии холеры ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
 Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40
 Телефон: (863) 240-9108
 E-mail: irina070769@mail.ru

Левченко Дарья Александровна, научный сотрудник лаборатории микробиологии холеры ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
 Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40
 Телефон: (863) 240-9108
 E-mail: dasha26091987@hotmail.com

Кругликов Владимир Дмитриевич, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией микробиологии холеры ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
 Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40
 Телефон: (863) 240-7908
 E-mail: vdkru58@mail.ru

Титова Светлана Викторовна, кандидат медицинских наук, директор института ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
 Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40
 Телефон: (863) 240-7908
 E-mail: titova_sv@antiplague.ru

Миронова Анна Витальевна, лаборант группы экологии холерных вибрионов лаборатории микробиологии холеры ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
 Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40
 Телефон: (863) 240-9108
 E-mail: super.monika2007@yandex.ru

Information about authors:

Elena A. Menshikova, PhD (Biology), head of group ecology of *Vibrio cholerae* microbiology laboratory, Rostov-on-Don Antiplague Institute of Rospotrebnadzor
 Address: 117/40 M. Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
 Phone: (863) 240-9108
 E-mail: super.monika2007@yandex.ru

Irina V. Arkhangelskaya, researcher of the laboratory of microbiology, Rostov-on-Don Antiplague Institute of Rospotrebnadzor
 Address: 117/40 M. Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
 Phone: (863) 240-9108
 E-mail: irina070769@mail.ru

Darya A. Levchenko, researcher of the laboratory of microbiology, Rostov-on-Don Antiplague Institute of Rospotrebnadzor
 Address: 117/40 M. Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
 Phone: (863) 240-9108
 E-mail: dasha26091987@hotmail.com

Vladimir D. Kruglikov, MD, PhD, DSc, head of the laboratory of microbiology of cholera, Rostov-on-Don Antiplague Institute of Rospotrebnadzor
 Address: 117/40 M. Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
 Phone: (863) 240-7908
 E-mail: vdkru58@mail.ru

Svetlana V. Titova, MD, PhD, director of Rostov-on-Don Antiplague Institute of Rospotrebnadzor
 Address: 117/40 M. Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
 Phone: (863) 240-7908
 E-mail: titova_sv@antiplague.ru

Anna V. Mironova, laboratory assistant of *V. cholerae* group, laboratory of microbiology of cholera, Rostov-on-Don Antiplague Institute of Rospotrebnadzor
 Address: 117/40 M. Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
 Phone: (863) 240-9108
 E-mail: super.monika2007@yandex.ru

Биологическая и генетическая характеристика холерного бактериофага Rostov 7

Н.Е.Гаевская, М.П.Погожова, А.С.Водопьянов, Р.В.Писанов,
Л.В.Романова, А.О.Аноприенко, С.Н.Головин, А.В.Тюрина

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

На сегодняшний день обнаружено множество генов интеграз, антибиотикорезистентности и токсинов, которые могут быть встроены в фаговый геном. Весьма актуальным является изучение выделенных фагов на предмет наличия в них этих генов. Наиболее информативным методом для выявления генетических детерминант факторов патогенности и интеграз является полногеномное секвенирование. Целью нашего исследования было изучить не только биологию холерного бактериофага *Vibrio phage Rostov 7*, но и провести полногеномное секвенирование с дальнейшей оценкой перспектив его практического использования. Наличие или отсутствие генетических детерминант факторов резистентности, токсинов и интеграз проверяли при помощи созданной нами базы данных и разработанного программного обеспечения под названием PhageAnalyzer. При помощи электронно-микроскопического исследования установлена морфология корпускул холерного бактериофага Rostov 7, а также подтверждена его специфичность. На газоне индикаторной культуры бактериофаг Rostov 7 образует прозрачные негативные колонии диаметром 1,0–1,5 мм. Анализ нуклеотидных последовательностей показал, что размер его генома составляет 45903 п.н. с общим количеством ORF 35, также обнаружены гены, характерные для хвостатых фагов. Установлено, что бактериофаг Rostov 7 имеет обособленное положение и является уникальным. В структуре генома найдены две интегразы (YP_009043902.1 и YP_009043892.1), поэтому использование фага в профилактических или лечебных препаратах исключено, так как он является умеренным. Генетических детерминант факторов антибиотикорезистентности и токсинов не обнаружено. В настоящее время бактериофаг активно используется в экспериментальной деятельности лаборатории и для конструирования диагностических препаратов. Полная геномная последовательность *Vibrio phage Rostov 7* депонирована в международной базе GenBank (NCBI) под номером MK575466.1.

Ключевые слова: *Vibrio phage Rostov 7*, Myoviridae, холера, секвенирование, бактериофаг

Для цитирования: Гаевская Н.Е., Погожова М.П., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Романова Л.В., Аноприенко А.О., Головин С.Н., Тюрина А.В. Биологическая и генетическая характеристика холерного бактериофага Rostov 7. Бактериология. 2019; 4(2): 27–30. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-27-30

Biological and genetic characteristics of the cholera bacteriophage Rostov 7

N.E.Gaevskaya, M.P.Pogozhova, A.S.Vodopyanov, R.V.Pisanov,
L.V.Romanova, A.O.Anoprienko, S.N.Golovin, A.V.Tyurina

Rostov-on-Don Plague Control Research Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation

Currently a variety of genes encoding integrases, antibiotic resistance, and toxins had been identified which maybe inserted into the phage genome. The study of isolated phages for the presence of these genes are highly relevant. The most informative method for identifying genetic determinants of pathogenicity factors and integrase is genome sequencing. The aim of our study was to study not only the biology of the cholera bacteriophage *Vibrio phage Rostov 7*, but also to conduct whole genome sequencing with a further assessment of the prospects for its practical use. The presence or absence of genetic determinants of resistance factors, toxins and integrase was checked with the help of the database created by us and the software developed, named "PhageAnalyzer". The morphology of the cholera bacteriophage Rostov 7 corpuscles was determined by means of electron microscopy, and this specificity was confirmed. On the lawn of the indicator culture, the bacteriophage Rostov 7 forms transparent negative colonies with a diameter of 1.0–1.5 mm. Analysis of the nucleotide sequences revealed that its genome size is 45903 bp with the total number of ORF 35, genes characteristic of caudate phages were also found. The bacteriophage Rostov 7 was shown to have a separate position and to be unique. Two integrases were found in the genome structure (YP_009043902.1 and YP_009043892.1), therefore, the use of phage in prophylactic or therapeutic preparations is excluded, since it is moderate. Genetic determinants of resistance factors and toxins were not detected. At the moment the bacteriophage is actively used in the experimental work of the laboratory. *Vibrio phage Rostov 7* can be successfully used to construct diagnostic products. The complete genomic sequence of *Vibrio phage Rostov 7* is deposited in the international database NCBI GenBank under the accession number MK575466.1.

Keywords: *Vibrio phage Rostov 7*, Myoviridae, cholera, sequencing, bacteriophage

For citation: Gaevskaya N.E., Pogozhova M.P., Vodopyanov A.S., Pisanov R.V., Romanova L.V., Anoprienko A.O., Golovin S.N., Tyurina A.V. Biological and genetic characteristics of the cholera bacteriophage Rostov 7. Bacteriology. 2019; 4(2): 27–30. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-27-30

Для корреспонденции:

Гаевская Наталья Евгеньевна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник, заведующая лабораторией бактериофагов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344000, Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-2857
E-mail: gaevskaya.nata@mail.ru

Статья поступила 21.03.2019 г., принята к печати 27.06.2019 г.

For correspondence:

Natalya E. Gaevskaya, MD, PhD, researcher, head of the bacteriophage laboratory, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute of Rosпотребнадзор
Address: 117/40 Maksima Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344000, Russian Federation
Phone: (863) 240-2857
E-mail: gaevskaya.nata@mail.ru

The article was received 21.03.2019 accepted for publication 27.06.2019

Продолжающаяся седьмая пандемия холеры привлекла пристальное внимание исследователей к проблеме холерных вибрионов. Бактериофаги являются постоянными спутниками холерных вибрионов, а их присутствие в клетках бактерий приводит к появлению новых свойств [1]. Фаги удобно использовать для решения таких вопросов, как взаимоотношение вируса с бактериальной клеткой [2], действие инактивирующих факторов на фаги, изменчивость свойств бактерий при передаче генетической информации фагами, а также разработка эффективных методов профилактики и фагодиагностики возбудителей болезней.

Вирулентные формы фагов являются основным элементом биологической борьбы с бактериальной инфекцией. Их поиск и изучение свойств представляют большой интерес [3]. Подтверждение вирулентности или умеренности бактериофага можно осуществить в ходе выявления генов, кодирующих известные интегразы [4]. Фаги идентифицируют как вирулентные, если у них нет гена интегразы. На сегодняшний день обнаружено множество генов интеграз, антибиотикорезистентности и токсинов, которые могут быть встроены в фаговый геном. Весьма актуальным является изучение выделенных фагов на предмет наличия в них этих генов. Наиболее информативным методом для выявления генетических детерминант факторов патогенности и интеграз является полногеномное секвенирование.

Цель исследования: изучить биологические свойства холерного бактериофага *Vibrio phage Rostov 7*, а также провести полногеномное секвенирование с дальнейшей оценкой перспектив его практического использования.

Материалы и методы

В исследование взят бактериофаг Rostov 7, выделенный нами ранее из окружающей среды. Источником выделения фага послужили пробы воды, доставленные для исследования на вибриофлору. Биологические свойства изучали общепринятыми методами [5]. Образцы просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1011. Электронограммы получены при помощи CDC-камеры Olympus-SIS-Veleta и программного обеспечения iTEM-TEMimagingPlatform. Выделение ДНК фагов проводили в соответствии с ранее описанными методиками [6–8]. Количество и качество выделенной ДНК контролировали электрофорезом в 0,8% агарозном геле. Отсутствие бактериальных хромосом в пробах подтверждали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием ген-специфичных праймеров для определения фрагментов ДНК *hly* и *ctx⁺*. Раствор фаговой ДНК хранили при температуре -20°C . Геномная последовательность бактериофагов была определена с использованием высокопроизводительного секвенирования (high-throughput sequencing) на платформе MiSeq (Illumina). Оценку первичных данных секвенирования проводили с использованием программы FastQC [9]. Для тримминга и коррекции ридов использовали алгоритмы Trimmomatic [10] и Lighter [11]. Сборку геномов, представленных в виде ридов, проводили с использованием программы Spades [12]. Сравнение собранного генома с аннотированными последовательностями известных бактериофагов проводили при помощи алгоритма

BLASTN 2.2.29 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Наличие или отсутствие генетических детерминант факторов резистентности, токсинов и интеграз проверяли при помощи созданной нами базы данных и разработанного программного обеспечения PhageAnalyzer, позволяющего проводить быстрый анализ данных полногеномного секвенирования бактериофагов.

Результаты и обсуждение

Выделенный нами из водных объектов окружающей среды при мониторинге холеры бактериофаг Rostov 7 на газоне индикаторной культуры образует прозрачные негативные колонии диаметром 1,0–1,5 мм. *Vibrio phage Rostov 7* активен в отношении *V. cholerae* O1 серогруппы биовара *El Tor*. Специфичность фага Rostov 7 в отношении хозяина подтверждена на большом наборе представителей близкородственных микроорганизмов семейств *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*. Спектр литической активности – 66,3%. Серологические свойства – VII серотип.

По данным электронно-микроскопического исследования холерный бактериофаг Rostov 7 относится по морфологии корпускул к V морфогруппе по классификации Тихоненко А.С. (1968) и типу A семейства *Myoviridae* по классификации Ackermann H.W. (1987) (рис. 1).

Vibrio phage Rostov 7 имеет отросток сложного строения, чехол которого способен к сокращению.

Анализ нуклеотидных последовательностей показал, что размер генома бактериофага Rostov 7 составляет 45903 п.н. с общим количеством ORF 35, также обнаружены гены, характерные для хвостатых фагов. Путем сравнения с имеющимися в NCBI генами обнаружено 28 ORF из рода *Vibrio* и 7 ORF из других родов с установленными функциями.

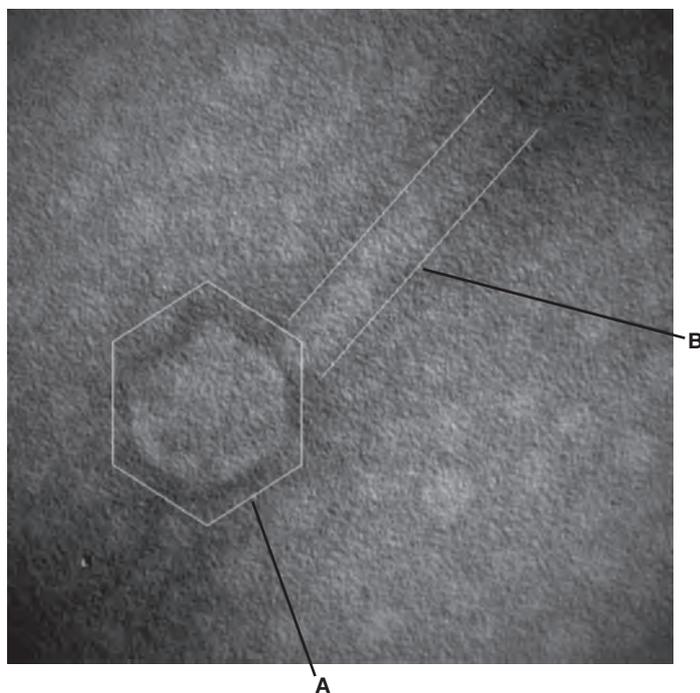


Рис. 1. Морфология холерного бактериофага Rostov 7 (увеличение $\times 150\,000$). А – многогранная головка ($453 \times 510 \text{ \AA}$); В – отросток (1023 \AA).

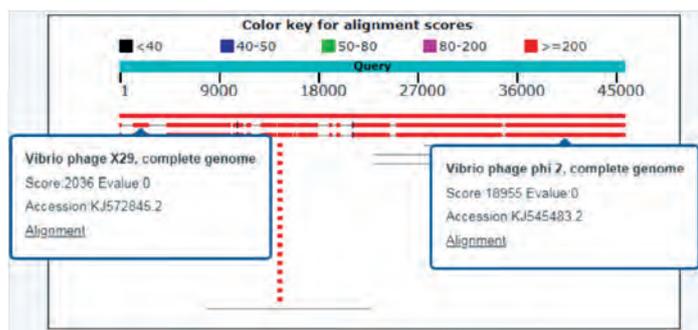


Рис. 2. Выравнивание ORF системой BLASTN.

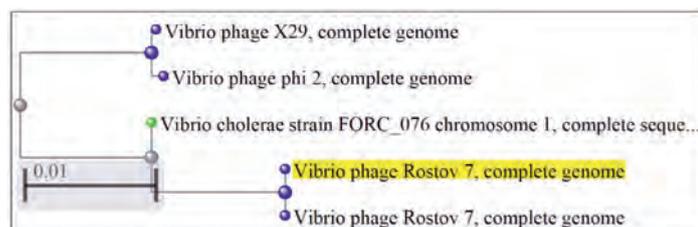


Рис. 3. Дендрограмма для *Vibrio phage Rostov 7*.

Обнаружены гомологичные последовательности в известных бактериальных геномах – гипотетические белки гамма-протеобактерий и профаг *Bacillus subtilis*. Также найдены две интегразы со сходством 96,6% (YP_009043902.1) и 94% (YP_009043892.1). Генетических детерминант факторов резистентности и токсинов не обнаружено.

После анализа данных, предоставленных системой BLASTN, были обнаружены всего лишь два холерных бактериофага, гомологичных Rostov 7, – X29 (KJ572845.2) и phi2 (KJ545483.2) с 83% перекрытием генов и идентичных на 98,15% и 98% соответственно, из группы *Vibrio phage* (рис 2). В сиквенсах найденных холерных фагов, так же как и у Rostov 7, найдены гены интеграз, значит, они являются умеренными.

На рисунке 2 видно, что процент совпадения генома Rostov 7 с фагами, найденными в системе BLASTN, невелик. Из дендрограммы на рисунке 3 понятно, что *Vibrio phage Rostov 7* имеет обособленное положение, поэтому считается уникальным.

Заключение

Для характеристики бактериофагов использования основных биологических методов исследования недостаточно. Полногеномное секвенирование дает более полную информацию о структуре и свойствах фагов, а также оказывается полезным для получения достоверных данных при тонкой внутривидовой дифференциации фагов.

В итоге нашего исследования было установлено, что бактериофаг Rostov 7 имеет обособленное положение и является уникальным. В структуре генома найдены две интегразы, поэтому использование фага в профилактических или лечебных препаратах исключено, так как он является умеренным. В настоящее время бактериофаг активно используется в экспериментальной деятельности лаборатории и для конструирования диагностических препаратов.

Полная геномная последовательность *Vibrio phage Rostov 7* депонирована в международной базе NCBI GenBank под номером MK575466.1.

Литература

- Ильина ТС. Механизмы горизонтального переноса генов: роль бактериофагов и интегров в эволюции патогенных бактерий. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2003;4:3-10.
- Каттер Э, Сулаквелидзе А. Бактериофаги: Биология и практическое применение. Пер. с англ. коллектив переводчиков; науч. ред. А.В.Летаров. М.: Научный мир; 2012, 640 с.
- Шлегель Г. Общая микробиология. Пер. с нем. М., 1987, 142 с.
- Groth AC, Calos MP. Phage Integrases: Biology and Applications. J Mol Biol. 2004 Jan 16;335(3):667-78. DOI: 10.1016/j.jmb.2003.09.082
- Adams MH. Bacteriophages. New York, N.Y.: Inter science Publishers; 1959, 620 p.
- Габрилович ИМ. Практическое пособие по бактериофагии. Минск, 1968, с. 10.
- Маниатис Т, Фрич Э, Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии: Молекулярное клонирование. Пер. с англ. М., 1984, 458 с.
- Yamamoto KR, Alberts BM, Benzinger R, Lawhorne L, Treiber G. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. Virology. 1970 Mar;40(3):734-44. DOI: 10.1016/0042-6822(70)90218-7
- Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data 2010. URL: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for illumina sequence data. Bioinformatics. 2014 Aug 1;30(15):2114-20. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Song L., Florea L. Langmead B. Lighter: fast and memory-efficient sequencing error correction without counting. Genome Biol. 2014;15(11):509. DOI: 10.1186/s13059-014-0509-9
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. J Comput Biol. 2012 May;19(5):455-77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021

References

- Ilyina TS. The mechanism of horizontal gene transfer: the role of bacteriophages and integrons in the evolution of pathogenic bacteria. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2003;4:3-10. (In Russian).
- Katter E, Sulakvelidze A. Bakteriofagi: biologiya i prakticheskoe primeneniye [Bacteriophages: biology and practical application]. A.V.Letarov (ed). Moscow: "Scientific World" Publ.; 2012, 640 p. (In Russian).
- Shlegel' G. Obshchaya mikrobiologiya [General Microbiology]. Moscow, 1987, 142 p. (In Russian).
- Groth AC, Calos MP. Phage Integrases: Biology and Applications. J Mol Biol. 2004 Jan 16;335(3):667-78. DOI: 10.1016/j.jmb.2003.09.082
- Adams MH. Bacteriophages. New York, N.Y.: Inter science Publishers; 1959, 620 p.
- Gabrilovich IM. Prakticheskoe posobie po bakteriofagii [Practical guide to bacteriophage]. Minsk, 1968, p. 10. (In Russian).
- Maniatis T, Frich E, Sembruk Dzh. Metody geneticheskoi inzhenerii: Molekulyarnoe klonirovanie [Genetic engineering techniques: Molecular cloning]. Moscow, 1984, 458 p. (In Russian).
- Yamamoto KR, Alberts BM, Benzinger R, Lawhorne L, Treiber G. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. Virology. 1970 Mar;40(3):734-44. DOI: 10.1016/0042-6822(70)90218-7
- Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data 2010. URL: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>

10. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Aug 1;30(15):2114-20. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170
11. Song L., Florea L. Langmead B. Lighter: fast and memory-efficient sequencing error correction without counting. *Genome Biol*. 2014;15(11):509. DOI: 10.1186/s13059-014-0509-9
12. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol*. 2012 May;19(5):455-77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021

Информация об авторах:

Погожова Марина Павловна, младший научный сотрудник лаборатории бактериофагов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344000, Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-2857

Водопьянов Алексей Сергеевич, кандидат медицинских наук, заведующий группой вирусологии ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344000, Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-2266

Писанов Руслан Вячеславович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией диагностики особо опасных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344000, Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-9113

Романова Людмила Васильевна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии микробов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344000, Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-2266

Аноприенко Анна Олеговна, младший научный сотрудник лаборатории бактериофагов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344000, Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-2857

Головин Сергей Николаевич, лаборант группы электронной микроскопии ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344000, Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, 117/40
Телефон: (863) 234-2311

Тюрина Анна Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории бактериофагов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344000, Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-2857

Information about authors:

Marina P. Pogozhova, junior researcher, laboratory of bakteriofages, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
Address: 117/40 Maksima Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344000, Russian Federation
Phone: (863) 240-2857

Alexey S. Vodopyanov, MD, PhD, head of the virology group, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
Address: 117/40 Maksima Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344000, Russian Federation
Phone: (863) 240-2266

Ruslan V. Pisanov, PhD (Biology), head of laboratory for diagnosis of especially hazardous infections, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
Address: 117/40 Maksima Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344000, Russian Federation
Phone: (863) 240-9113

Lyudmila V. Romanova, MD, PhD, DSc, senior researcher of the microbial biochemistry laboratory, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
Address: 117/40 Maksima Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344000, Russian Federation
Phone: (863) 240-2266

Anna O. Anoprienko, junior researcher, laboratory of bakteriofages, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
Address: 117/40 Maksima Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344000, Russian Federation
Phone: (863) 240-2857

Sergey N. Golovin, laboratory assistant, electron microscopy group, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
Address: 117/40 Maksima Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344000, Russian Federation
Phone: (863) 234-2311

Anna V. Tyurina, junior researcher, laboratory of bakteriofages, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
Address: 117/40 Maksima Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344000, Russian Federation
Phone: (863) 240-2857

НОВОСТИ НАУКИ

Компания Hologic Inc. получила одобрение Европейского Сообщества на применение Panther Fusion Bordetella. Это набор для ПЦР-анализа в реальном времени для выявления и дифференциации *Bordetella pertussis* и *Bordetella parapertussis* из образцов мазков из носоглотки, взятых у пациентов с симптомами заболевания. Система позволяет лабораториям обрабатывать до 500 анализов за 8 часов.



Bordetella assay now CE marked Europe [Electronic resource].

URL: <https://www.clinlabint.com/detail/clinical-laboratory/bordetella-assay-now-ce-marked-europe/>

Экспрес-тест на *S. pneumoniae* и *L. pneumophila*

Streptococcus pneumoniae является основной причиной внебольничной пневмонии, а *Legionella pneumophila* является причиной дорогостоящих госпитализаций и интенсивной терапии. Клинически различать две бактерии сложно, и из-за различий в лечении заболеваний руководящие принципы рекомендуют двойное тестирование.

Тест ImmuView Antigen позволяет теперь легко различать оба микроорганизма у пациентов с предполагаемой инфекцией, что позволяет врачам начать правильное лечение антибиотиками. Это единственный быстрый тест, который определяет и *Streptococcus pneumoniae*, и *Legionella pneumophila* в одном тесте. ImmuView очень прост в использовании, не требует специального оборудования и показывает результат всего за несколько минут. На самом деле, всего за 3 простых шага, он определяет, есть ли у пациента двойная инфекция или нет, инфекция пневмонии, инфекция *Legionella* или ничего из этого.

S. pneumoniae and *L. pneumophila* rapid test [Electronic resource].

URL: <https://www.clinlabint.com/detail/clinical-laboratory/s-pneumoniae-and-l-pneumophila-rapid-test/>

Опыт выделения *Listeria monocytogenes* на территории Вологодской области

Е.А.Алексеева¹, А.П.Шепелин², О.В.Полосенко²

¹ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Вологодской области», Вологда, Российская Федерация;

²ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в борьбе с некоторыми инфекционными заболеваниями, существует ряд инфекций, диагностика которых до сих пор затруднена. Так, к числу открытых в XX в. инфекционных заболеваний с доказанной нозологической самостоятельностью относится листериоз, возбудитель которого широко распространен в природе и вызывает острые инфекционные заболевания у людей и животных. Хотя листериоз не является распространенной инфекцией и уступает таким заболеваниям, как сальмонеллез и кампилобактериоз по количеству выявленных случаев, он значительно превосходит их по тяжести клинического процесса и доле летальных исходов.

Проведено бактериологическое исследование клинического материала от заболевших людей. Результаты анализа биологических свойств выделенных культур изолятов доказывает принадлежность их к виду *Listeria monocytogenes*.

Ключевые слова: листериоз, факторы патогенности, идентификация, питательные среды

Для цитирования: Алексеева Е.А., Шепелин А.П., Полосенко О.В. Опыт выделения *Listeria monocytogenes* на территории Вологодской области. Бактериология. 2019; 4(2): 31–36. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-31-36

Experience a selection of *Listeria monocytogenes* in the territory of the Vologda region

E.A.Alekseeva¹, A.P.Shepelin², O.V.Polosenko²

¹Centre of Hygiene and Epidemiology in Vologda Oblast, Vologda, Russian Federation;

²State Research Center for applied microbiology and biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Russian Federation

Despite the undoubted successes in combating certain infectious diseases, there are a number of infections, the diagnosis which still hampered. So, to open in the last XX century infectious diseases with proven nosological autonomy applies listeriosis, exciter which is widely distributed in nature and causes acute infectious diseases in humans and animals. *Listeria* is not a common infection and, behind diseases such as salmonellosis and Campylobacteriosis on the number of diagnosed cases, far exceeds them by severity of the clinical process and the proportion of deaths. Bacteriological study conducted clinical material from sick people. The results of the analysis of the biological properties of cultures of isolates proves belonging them according to their typical *Listeria monocytogenes* biological properties.

Keywords: *Listeria*, factors of pathogenicity, identification, nourishing wednesday

For citation: Alekseeva E.A., Shepelin A.P., Polosenko O.V. Experience a selection of *Listeria monocytogenes* in the territory of the Vologda region. Bacteriology. 2019; 4(2): 31–36. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-31-36

Листериоз пищевого происхождения – одна из самых тяжелых болезней современности. Его возбудителем является бактерия *Listeria monocytogenes*. Это относительно редкая болезнь – ежегодно происходит до 10 случаев заболевания на 1 млн человек в зависимости от стран и регионов. И хотя случаев заболевания немного, эта инфекция представляет значительную проблему в области общественного здравоохранения в связи с высокой смертностью.

Заболеваемость листериозом в 2017 г. в высокоразвитых 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. 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

Для корреспонденции:

Алексеева Елена Андреевна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией бактериальных и паразитарных инфекций ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Вологодской области»

Адрес: 160001, Вологда, ул. Яшина, 1А

E-mail: elenaalekseeva182@rambler.ru

Статья поступила 18.03.2019 г., принята к печати 27.06.2019 г.

For correspondence:

Elena A. Alekseeva, MD, PhD, head of the laboratory of bacterial and parasitic infections, Center for Hygiene and Epidemiology in the Vologda Region

Address: 1A Yashina str., Vologda, 160001, Russian Federation

E-mail: elenaalekseeva182@rambler.ru

The article was received 18.03.2019, accepted for publication 27.06.2019

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 показателей заболеваемости в Сибирском и Дальневосточном округах Российской Федерации (РФ) [1]. По данным Государственного доклада за 2018 г., было зарегистрировано 75 случаев листериоза, что составляет в среднем по стране 0,054 случаев на 100 тыс. населения [2].

По статистическим данным Роспотребнадзора, в Вологодской области за период с 1992 г. по настоящее время было официально зарегистрировано 6 случаев листериоза: по одному случаю в 2003, 2007, 2008, 2011, 2015 и 2016 гг. [3]. Из них 2 случая были летальными.

По международному классификатору болезней МКБ-10 листериоз представлен в нескольких позициях (табл. 1) [4].

Оценивая частоту эпидемических вспышек, число пострадавших и тяжесть заболевания, международные организации признают наиболее эмерджентными бактериями также и представителя рода *Listeria*. Учитывая большую значимость проблемы, представляется необходимым проведение исследований для выяснения природных источников распространения *L. monocytogenes*, факторов вирулентности, патогенеза и механизмов возникновения инфекций, обусловленных патогеном [5].

Особое значение в патологии человека имеет возможность передачи листерий от инфицированной беременной женщины к плоду. Причем это может происходить как нисходящим (*per os*), так и восходящим путем (*per vagina*).

Возбудителем листериоза у людей чаще всего является *L. monocytogenes*, хотя нельзя исключать возможности заражения любым другим видом из 19 известных. Остается неизученной циркуляция листерий во многих регионах

России. Огромной проблемой на сегодняшний день является то, что во многих лабораториях не проводится серо- и фаготипирование листерий, в то время как известен факт, что *L. monocytogenes* серогруппы 4b обусловил 90% эпидемических случаев.

Имеются данные о наличии у листерий факторов патогенности, обеспечивающих их адгезию, колонизацию, инвазию и персистенцию в организме человека (табл. 2). Однако эти данные локальны и отражают особенности популяций на определенных территориях. Особый интерес представляет вопрос о патогенных свойствах листерий, выделяемых от больных и из объектов внешней среды [6, 7].

Введение обязательных регламентированных требований санитарно-бактериологического контроля за обсемененностью пищевых продуктов патогенными штаммами листерий позволило обратить более пристальное внимание на проблему листериоза, что выявляет реальную картину распространенности этой инфекции во всех регионах России.

Анализ состояния лабораторной диагностики листериоза позволяет предположить, что зарегистрированный уровень заболеваемости представляет лишь «вершину айсберга», и при совершенствовании организационных и методических вопросов лабораторной диагностики число зарегистрированных больных может значительно возрасти.

Ранняя лабораторная диагностика, т.е. своевременное выявление источника инфекции, занимает основное место в системе противоинфекционных мероприятий. Современная микробиология характеризуется развитием диагностических технологий, основанных на глубоких фундаментальных знаниях биологии микроорганизмов и передовых инженерно-технических решениях задач автоматизации и повышения эффективности анализа [6, 7]. В связи с этим возникает необходимость в совершенствовании имеющихся бактериологических и иммунобиологических методов, создании новых экспресс-методов диагностики и индикации, направленных на сокращение времени проведения анализа, его упрощение при одновременном увеличении надежности и легкости интерпретации полученных результатов при высокой чувствительности и специфичности.

Для выделения и накопления *L. monocytogenes* в практических лабораториях Российской Федерации рекомендуется использование сухих коммерческих селективных питательных сред зарубежных производителей. Однако использование этих сред в России крайне ограничено по причине их высокой стоимости. В то же время становятся доступными питательные среды для культивирования, выделения и идентификации листерий отечественных производителей.

Цель исследования: выделение и идентификация листерий из клинического материала с применением отечественных и зарубежных питательных сред, а также экспресс-методов на территории Вологодской области.

Материалы и методы

В лаборатории бактериальных и паразитарных инфекций ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Вологодской области» (далее ЛБиПИ ФБУЗ) были проведены исследования образцов клинического материала от беременных и

Таблица 1. **Формы листериозной инфекции по МКБ-10**

Код подраздела	Наименование заболевания
A32.0	Кожный листериоз
A32.1+	Листериозный менингит и менингоэнцефалит
A32.7	Листериозная септицемия
A32.8	Другие формы листериоза
A32.9	Листериоз неуточненный
P37.2	Неонатальный (диссеминированный) листериоз

Таблица 2. **Патогенный потенциал представителей рода *Listeria***

Ген	Белок	Функции
<i>prfA</i>	PrfA	регуляция транскрипции генов вирулентности
<i>aut</i>	Auto	фактор адгезии
<i>ami</i>	Ami	колонизация
<i>fbpA</i>	FbpA	колонизация
<i>inlA, inlB, inlC, inlJ</i>	интернарины	индукция фагоцитоза
<i>hly</i>	листериолизин O	лизис фагосом
<i>plcA</i>	фосфолипаза	лизис фагосомы, персистенция
<i>plcB</i>	лецитиназа	лизис фагосомы, персистенция
<i>actA</i>	ActA	полимеризация актлина, инвазия
<i>svpA</i>	SvpA	персистенция
<i>hlyA</i>	HlyA	гемолизин
<i>clpC, clpB</i>	ClpC, ClpB	выживание при перепадах температуры

Таблица 3. Исследованные образцы клинического материала

Наименование материала	Количество
Околоплодные воды	3
Плацента	2
Кровь на стерильность	3
Мазок из уха	2
Мазок из зева	2
Содержимое везикул	5

новорожденных с применением зарубежных и отечественных питательных сред, экспресс-методов с целью выделения и идентификации листерий.

В работе использованы 17 образцов клинического материала из реанимационных отделений детского стационара и гинекологического отделения (табл. 3).

Культивирование листерий проводили на питательных средах: бульон Фразера полуконцентрированный (HiMedia, Индия); селективный накопительный бульон UVM (Merck, Германия); питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ I; Фрейзера, основа) (Оболensk, Россия).

Для накопления культур, изучения биохимической характеристики и идентификации изолятов использовали: мясо-пептонный агар с 1% глюкозы (Оболensk, Россия); триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом (TSYEA) (HiMedia, Индия); триптиказо-соевый агар (TSA) (HiMedia, Индия); мясо-пептонный бульон (МПБ) с 1% глюкозы (Оболensk, Россия); триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом (TSYEB) (HiMedia, Индия); PALCAM agar (HiMedia, Индия); Oxford agar (Oxoid, Великобритания); ПАЛ-агар (Оболensk, Россия) и ALOA – по Оттавиани и Агости (Германия).

Видовую идентификацию штаммов листерий осуществляли следующими методами:

- биохимическая идентификация с применением тест-систем «API *Listeria* идентификация рода *Listeria*» (БиоМерье, Франция);
- серотипирование в реакции латекс-агглютинации (ЛАГ) на стекле с помощью «Латексной тест-системы *Listeria monocytogenes*» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболensk, Россия);
- ПЦР анализ с использованием коммерческой тест-системы «*Listeria monocytogenes*-EPP» (АмплиСенс, ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия).

Результаты и обсуждение

В настоящее время бдительность в отношении врожденного листериоза среди практикующих акушеров-гинекологов и неонатологов значительно снизилась. Одним из ключевых факторов явилась низкая востребованность со стороны клиницистов в исследованиях на листериоз, которая привела к тому, что многие больничные бактериологические лаборатории перестали оснащаться специальными средами для детекции *Listeria monocytogenes* [8].

Снижение уровня клеточного иммунитета во время беременности обуславливает повышенную восприимчивость к листериозной инфекции.

В 2016 г. в Вологодской области был зарегистрирован случай листериоза у беременной женщины (22 нед). Заболевание началось с гриппоподобного синдрома с повышением температуры и общим недомоганием. Стационарное

лечение с применением антибиотикотерапии не дало положительных изменений, в результате чего возбудитель попал в кровь, обусловив развитие листериозного сепсиса и вызвав внутриутробную гибель плодов. За месяц до развития заболевания пациентка перенесла кишечную инфекцию невыясненной этиологии, что позволяет предположить пищевой путь заражения данной инфекцией с развитием листериоза беременных, внутриутробным поражением плодов и развитием листериозного сепсиса.

В 2015 г. от листериоза пострадал новорожденный. Заболевание возникло на 6-й день от рождения с кожных проявлений. Первично был поставлен диагноз «везикулез». При классическом бактериологическом исследовании отделяемого везикул, а также мазка из зева и уха, воспалительные явления которых присоединились позже, был выделен возбудитель *Listeria monocytogenes*. Также возбудитель был выделен из околоплодных вод у матери.

Лабораторная диагностика состояла из посевов на питательные среды, идентификации выделенных культур по культурально-биохимическим, серологическим свойствам и молекулярным методом.

Бактериологический метод диагностики, описанный в Методических рекомендациях по лабораторной диагностике листериоза животных и людей (утв. Министерством здравоохранения СССР и Госагропромом СССР 4 сентября 1986 г. и 13 февраля 1987 г.), остается необходимым и востребованным [9].

В связи с тем что в настоящее время на первое место в патологии выходит пищевой листериоз, весь спектр современных методических подходов используется при выявлении листерий в продуктах питания, указанных в МУК 4.2.1122-02 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах», ГОСТ 32031-2012 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*» [10, 11].

Накопление, выделение и культивирование, а затем и идентификацию выделенных культур проводили вышеизложенными методами с применением отечественных и зарубежных питательных сред. Для работы с клиническим материалом (околоплодные воды, мазок из везикул, кровь) была использована схема первичного посева с предварительным селективным обогащением и высевом на плотные питательные среды, с дальнейшей идентификацией микроорганизмов к роду *Listeria*.

Первичный посев проводился на агаризованные питательные среды: кровяной агар, PALCAM agar (HiMedia, Индия), ПАЛ-агар (Оболensk, Россия), ALOA – по Оттавиани и Агости (Германия).

Предварительное селективное обогащение: клинический материал засеивали в 10 мл среды для накопления (бульон Фразера полуконцентрированный (HiMedia, Индия); селективный накопительный бульон UVM (Merck, Германия); питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ I); селективный бульон для обогащения листерий сухой (бульон Фрейзера, основа) (Оболensk, Россия) и инкубировали в термостате при температуре 30°C в течение 24 ч. При росте листерий на средах предобогащения, содержащих эскулин и цитрат железа аммонийного, наблюдалось почернение среды за счет гидролиза гликозида эскулина до глю-

козы и эскулетина. В результате реакции эскулетина с ионами железа образуется комплекс черного или оливкового цвета (рис. 1).

Селективное обогащение. Через 24 ч после предварительного обогащения проводили пересев 0,1 мл материала в 9 мл среды для вторичного накопления (бульон Фразера концентрированный (HiMedia, Индия); селективный накопительный бульон UVM (Merck, Германия); питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ II) (Оболенск, Россия)) с последующей инкубацией в термостате при температуре 37°C в течение 24–48 ч. Штаммы рода *Listeria* при селективном обогащении вызывают небольшое помутнение среды с образованием слизистого осадка (рис. 2).

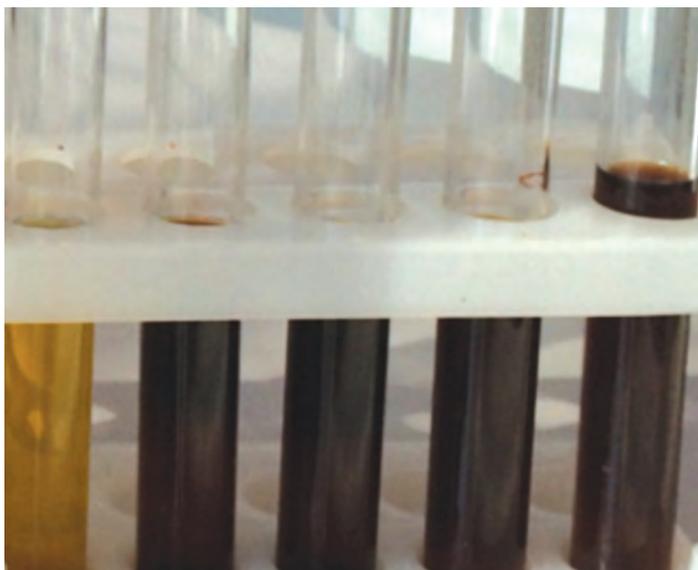


Рис. 1. Рост листерий в бульоне Фрейзера. Слева направо: прозрачная – незасеянная среда. Почернение среды – рост листерий.

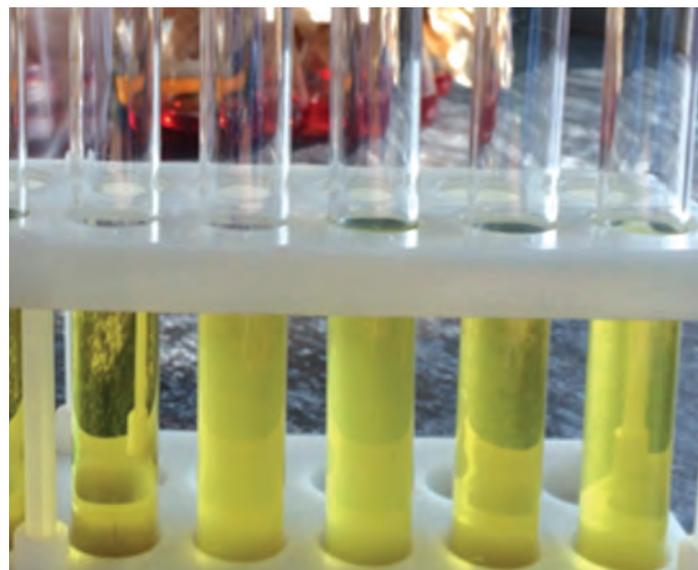


Рис. 2. Рост листерий в питательном бульоне (ПБЛ II). Слева направо: прозрачная – незасеянная среда. Помутнение среды – рост листерий.



Рис. 3. Рост листерий на PALCAM-агаре.

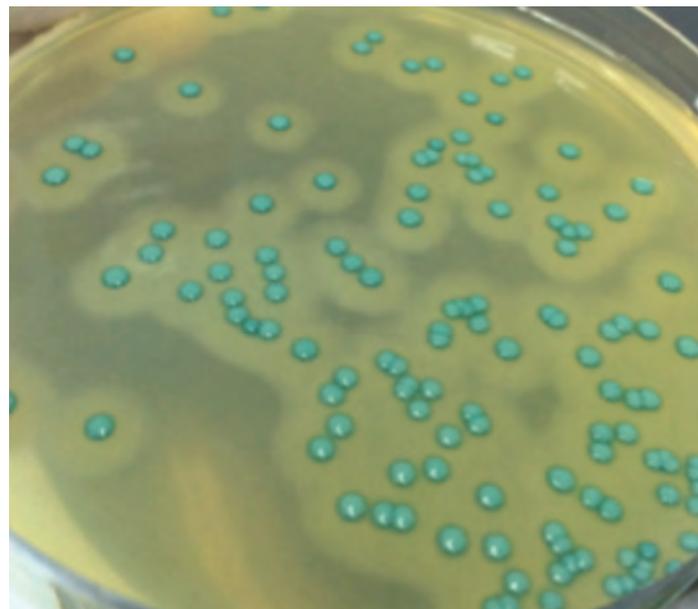


Рис. 4. Рост листерий на среде ALOA агар *Listeria* по Оттавиани и Агости.

На Оксфордском агаре (Oxford agar) листерии, выращенные в течение 24 ч, мелкие (1 мм), сероватые, окруженные черным ореолом. Через 48 ч – более темные, около 2 мм в диаметре, с черным ореолом и углубленным центром. На ALOA – агаре *Listeria* по Оттавиани и Агости *L. monocytogenes* растут в виде сине-зеленых колоний, окруженных непрозрачным ореолом (типичные колонии) (рис. 4). На кровяном агаре вокруг колоний наблюдалась узкая зона гемолиза.

Морфологическая оценка выделенных культур листерий при использовании как зарубежных, так и отечественных сред была идентична: короткие палочки с закругленными концами, располагающиеся поодиночке или в виде коротких цепочек; грамположительные, спор и капсул не образуют, имеют несколько перитрихально расположенных жгутиков (рис. 5).

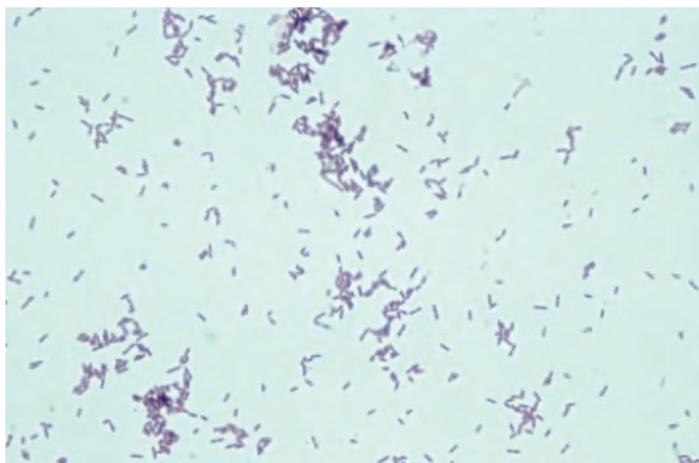


Рис. 5. Мазок по Граму *L. monocytogenes*.



Рис. 6. Биохимическая идентификация на тест-системе «API *Listeria* идентификация рода *Listeria*».

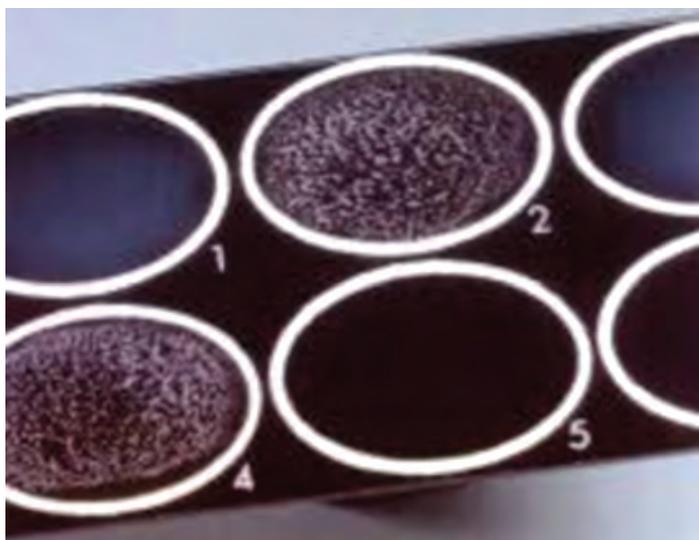


Рис. 7. Латекс-агглютинация *L. monocytogenes*.

Для определения биохимической характеристики *L. monocytogenes* использовали коммерческую тест-систему «API *Listeria* идентификация рода *Listeria*». *L. monocytogenes* по своим свойствам не выделяют индол и сероводород, не восстанавливают нитраты в нитриты, желатин не разжижают, ферментируют с образованием кислоты без газа глюкозу, левулезу, трегалозу, непостоянно и медленно – мальтозу, лактозу, сахарозу, декстрин, салицин, рамнозу, растворимый крахмал (рис. 6).

С помощью классического бактериологического метода были выявлены и идентифицированы микроорганизмы рода листерии на питательных средах как отечественного, так и импортного производства.

Подозрительные на принадлежность к роду *Listeria* колонии с чашек подвергались дальнейшему исследованию с помощью серологического метода в реакции латекс-агглютинации (ЛАГ) на стекле «Латексной тест-системы *Listeria monocytogenes*» (рис. 7). В результате была подтверждена родовая и видовая принадлежность к листериям изучаемых изолятов.

Дополнительно для диагностики как экспресс, так и как подтверждающий метод использовалась полимеразная цепная реакция (ПЦР) «*Listeria monocytogenes*-EPF» (АмплиСенс, ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Москва, Россия). Этот экспрессный способ позволил получить результаты исследования, совпадающие на 99% с результатами ЛАГ на стекле.

Также было замечено, что при исследовании клинического материала использование сред обогащения приводило к вытеснению количества патогенных листерий и искажению результатов исследования, что согласуется с наблюдениями ряда исследователей. Поэтому крайне важно получить результат исследования из первичных посевов.

Таким образом, в соответствии с общепринятой схемой диагностики листериоза, включающей все вышеуказанные современные диагностические тесты, из крови беременной при посеве на стерильность выявлена *Listeria monocytogenes*. В случае с новорожденным правильное бактериологическое исследование позволило выявить неонатальный листериоз.

Анализ результатов исследования допустил установить, что в обоих случаях своевременная и качественная бактериологическая диагностика позволила сохранить жизни пациентам.

Кроме того, штаммы *L. monocytogenes*, выделенные из клинического материала беременных и новорожденных, дополнительно были подтверждены с помощью молекулярного метода.

Несмотря на то что молекулярный метод является важным инструментом в диагностике и исследовании многих возбудителей инфекционных болезней, а количество лабораторных исследований с помощью ПЦР продолжает стремительно расти, результаты, полученные классическим культуральным методом, являются основополагающими при идентификации листерий из образцов.

Выводы

Для выявления истинной заболеваемости листериозом и снижения смертности на территории Вологодской области

и РФ необходимо обязательное обследование клинического материала у беременных на разных сроках.

При диагностике листериоза культуральный метод с посевом клинического материала на питательные среды остается одним из основных, несмотря на весь спектр современных методических подходов.

Использование при выделении *L. monocytogenes* из клинического материала, как зарубежных, так и отечественных питательных сред по совокупности признаков и достигаемому эффекту при проведении микробиологических исследований не изменяет стереотипы работы диагностических лабораторий практического здравоохранения. В данной ситуации представляется важным применение стандартных качественных отечественных питательных сред для получения достоверных результатов исследований при диагностике листериоза.

Серологические методы типирования также хорошо себя зарекомендовали при идентификации *L. monocytogenes*, а также являются актуальными для быстрой постановки диагноза и эффективного назначения своевременной антибактериальной терапии.

Поскольку *L. monocytogenes* имеет наибольшее этиологическое значение в развитии заболевания, то любой из перечисленных методов выявления и идентификации заслуживает внимания и может быть использован в зависимости от уровня оснащённости бактериологической лаборатории.

Литература

1. Деревянченко ИА, Смирнова ЕВ, Краева ЛА. Инновационные приемы при бактериологическом исследовании на листериоз. Бактериология. 2018; 3(4):21-5. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-21-25
2. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году». М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2019, 254 с.
3. Роспотребнадзор [Электронный ресурс]. Доступно по: <https://www.rospotrebnadzor.ru/u>
4. Международная классификация болезней [Электронный ресурс]. Доступно по: <https://www.mkb10.ru>
5. Габидова АЭ, Фахрутдинов АМ, Галынкин ВА. Экология и резистентность. Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета). СПб.: Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет); 2016.
6. Алиева ЕВ, Афанасьев ЕН, Тюменцева ИС. Новое в диагностике кампилобактериоза и листериоза. Вестник Российской военно-медицинской академии. 2006; приложение 1 (15):221.
7. Тартаковский ИС, Малеев ВВ, Ермолаева СА. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. М.: Медицина для всех; 2002, 200 с.
8. Садова НВ. Врожденный листериоз. Русский медицинский журнал. 2008;18:1162.
9. Методические рекомендации по лабораторной диагностике листериоза животных и людей (утв. Министерством здравоохранения СССР и Госагропромом СССР 4 сентября 1986 г. и 13 февраля 1987 г.).
10. ГОСТ 32031-2012 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*». М.: Стандартинформ; 2014.
11. МУК 4.2.1122-02 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах». Методические указания. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России; 2002.

References

1. Derevjanchenko IA, Smirnova EV, Krayeva LA. Innovative approaches at bacteriological research on listeriosis. Bacteriology. 2018;3(4):21-5. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-21-25 (In Russian).
2. State Report "On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2018". Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; 2019, 254 p. (In Russian).
3. Rospotrebnadzor [Electronic resource]. Available at: <https://www.rospotrebnadzor.ru/u>
4. International classification of diseases [Electronic resource]. Available at: <https://www.mkb10.ru> (In Russian).
5. Gabidova AE, Fakhrutdinov AM, Galynkin VA. Ecology and the resistance. Bulletin of Saint-Petersburg state technological Institute. St.Petersburg: Saint-Petersburg State Institute of Technology; 2016. (In Russian).
6. Alieva EV, Afanas'ev EN, Tyumentseva IS. Novee v diagnostike kampilobakterioza i listerioza. Bulletin of the Russian Military Medical Academy. 2006; Suppl 1 (15): 221. (In Russian).
7. Tartakovskii IS, Maleev VV, Ermolaeva SA. Listerii: rol' v infektsionnoi patologii cheloveka i laboratornaya diagnostika. Moscow, 2002, 200 p. (In Russian).
8. Sadova NV. Vrozhdennyi listerioz. RMJ (Russian Medical Journal). 2008;18:1162. (In Russian).
9. Guidelines for laboratory diagnosis of listeriosis of animals and humans (UTV. The Ministry of health of the USSR and the USSR state agricultural 4 September 1986 and 13 February 1987). (In Russian).
10. GOST 32031-2012 "Food Products. Methods for detecting *Listeria monocytogenes* bacteria". Moscow: "Standartinform" Publ.; 2014. (In Russian).
11. МУК 4.2.1122-02 "Organization of control and methods of detection of *Listeria monocytogenes* bacteria in food products". Methodical Instructions. Moscow, 2002. (In Russian).

Информация об авторах:

Шепелин Анатолий Прокопьевич, доктор биологических наук, заместитель директора по научно-производственной работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский район, г.п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0020
E-mail: shepelin@obolensk.org

Полосенко Ольга Вадимовна, кандидат биологических наук, заведующая сектором микробиологических исследований ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский район, г.п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0017
E-mail: polosenko@obolensk.org

Information about authors:

Anatoly P. Shepelin, PhD, DSc (Biology), deputy director for science and production, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor
Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0020
E-mail: shepelin@obolensk.org

Olga V. Polosenko, PhD (Biology), chief of microbiological research department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0017
E-mail: polosenko@obolensk.org

Мониторинг психофизиологической адаптации специалистов, работающих с патогенными биологическими агентами I–II групп

Т.А.Малюкова

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

Приоритетными задачами для обеспечения безопасности функционирования учреждений, осуществляющих деятельность с патогенными биологическими агентами (ПБА) I–II групп, являются реализация системного подхода, направленного на предотвращение или снижение негативного воздействия биологических факторов, модернизация систем контроля и управления рисками при потенциальных чрезвычайных ситуациях. При этом ведущая роль принадлежит надежности профессиональной деятельности сотрудников, одной из базовых компонент которой определен уровень их психофизиологической адаптации.

Цель исследования – апробация методов формализованной оценки психофизиологической адаптации специалистов, допускаемых к работам с ПБА I–II групп. Использованы метод экспертных оценок и валидные методы анализа психофизиологического, физиологического и психического состояния. Применение аппаратно-программного комплекса «АПК ПФС-КОНТРОЛЬ» повышает объективность и информативность обследования, позволяет осуществлять мониторинг психофизиологической адаптации работников, выявить лиц, нуждающихся в коррекции профессионального здоровья, определить направление реабилитации и оценить ее эффективность. Комплексный анализ профессионального здоровья работников с целью допуска к манипуляциям с ПБА I–II групп целесообразно дополнить оценкой психофизиологической адаптации, что актуально для обеспечения социально приемлемого уровня надежности профессиональной деятельности.

Ключевые слова: биологическая безопасность, патогенные биологические агенты I–II групп, надежность профессиональной деятельности, психофизиологическая адаптация

Для цитирования: Малюкова Т.А. Мониторинг психофизиологической адаптации специалистов, работающих с патогенными биологическими агентами I–II групп. Бактериология. 2019; 4(2): 37–41. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-37-41

Monitoring of the psycho-physiological adaptation of the specialists working with pathogenic biological agents of the I–II groups of hazard

T.A.Malyukova

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe” of the Rospotrebnadzor, Saratov, Russian Federation

Priority tasks for the safety provision of activities performed by the institutions working with pathogenic biological agents of the I–II groups of hazard (PBA) are implementation of systemic approach aimed at prevention or reduction of negative impact of biological factors; modernization of system for control and management of risks in case of potential emergencies. Thereat, the leading role belongs to the occupational/professional activities of the staff, one of the basic elements of which is the level of psycho-physiological adaptation of workers.

Objective of the study was testing the methods for formal assessment of psycho-physiological adaptation of the specialists allowed to work with PBA of the I–II groups of hazard. Utilized was the method of expert estimates and valid methods of psycho-physiological (PPS), physical, and psychological state analysis. Application of hardware and software complex “HSC PPS-CONTROL” increases the level of objectivity and improves the information content of the research, allows for proper monitoring of psycho-physiological adaptation of the personnel, detection of persons in need of occupational health interventions, specification of rehabilitation course and assessment of its effectiveness. It is a good practice to supplement the complex analysis of occupational health, carried out to grant the permission for handling PBA of the I–II groups of hazard, with assessment of psycho-physiological adaptation which is relevant for the provision of socially acceptable level of reliability of professional activities.

Keywords: biological safety, pathogenic biological agents of the I–II groups of hazard, reliability of professional activities, psycho-physiological adaptation

For citation: Malyukova T.A. Monitoring of the psycho-physiological adaptation of the specialists working with pathogenic biological agents of the I–II groups of hazard. Bacteriology. 2019; 4(2): 37–41. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-37-41

Для корреспонденции:

Малюкова Татьяна Анатольевна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46

Телефон: (8452) 51-5230

E-mail: rusrapi@microbe.ru

Статья поступила 16.04.2019 г., принята к печати 27.06.2019 г.

For correspondence:

Tatiana A. Malyukova, MD, PhD, leading researcher in the department of educational programs and training of specialist, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe” of the Rospotrebnadzor

Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation

Phone: (8452) 51-5230

E-mail: rusrapi@microbe.ru

The article was received 16.04.2019, accepted for publication 27.06.2019

Актуальность совершенствования системы биобезопасности функционирования учреждений, работающих с опасными биологическими факторами, определена в указе Президента Российской Федерации №97 от 11 марта 2019 года «Основы государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2025 года и дальнейшую перспективу». В качестве одной из основных причин, усугубляющих негативное воздействие опасных биологических факторов на современном этапе, обозначена вероятность возникновения биологических катастроф вследствие аварий и (или) диверсий на объектах, где проводят работы с патогенными микроорганизмами. К приоритетным задачам отнесены обеспечение системного подхода при реализации мероприятий, направленных на предотвращение или снижение негативного воздействия биологических факторов; повышение надежности функционирования и уровня безопасности биологически опасных объектов; модернизация систем контроля и управления рисками при чрезвычайных ситуациях и ликвидации их последствий.

Анализ проблемы безопасности эксплуатации организаций и учреждений, использующих опасные производственные технологии [1], в том числе возбудителей инфекционных болезней человека, наглядно показывает, что ведущая роль принадлежит надежности профессиональной деятельности (НПД) персонала [2, 3]. НПД работника – интегральный показатель, на уровень которого влияют профессиональное здоровье, профессиональная подготовленность и профессиональная успешность [2]. Важнейшим условием безаварийной работы является соответствие характеристик профессионального здоровья и адаптация работника, в том числе психофизиологическая адаптация (ПФА), к условиям профессиональной деятельности. Уровень ПФА характеризует результат приспособления работника к реальным условиям труда (ритм, график, санитарно-гигиенические условия), рабочему месту (шум, освещенность и прочее), психическим и физическим нагрузкам [4]. Следовательно, это системный ответ организма человека на действие внешних и внутренних стимулов и факторов, направленный на достижение полезного приспособительного результата в процессе профессиональной деятельности [2, 5, 6]. ПФА рассматривается и как процесс (4 стадии), и как результат [7, 8]. Переход к стабильной работе, как правило, наступает через 1–1,5 года в результате постепенного преодоления производственных и межличностных проблем. Вместе с тем нельзя исключить риск снижения ПФА и, как следствие, снижение НПД и повышение вероятности аварии при работе. Таким образом, мониторинг ПФА актуален для оценки и прогноза надежности профессиональной деятельности, профессиональной успешности, профессионального здоровья сотрудников и, в итоге, для обеспечения биологической безопасности в учреждении, использующем патогенные биологические агенты (ПБА) I–II групп.

Вместе с тем в действующих на территории Российской Федерации нормативных документах по безопасности работ с ПБА отсутствуют требования о проведении оценки ПФА и рекомендованные методы исследования.

Цель исследования – апробация методов формализованной оценки психофизиологической адаптации специалистов, допускаемых к работам с ПБА I–II групп.

Материалы и методы

Использованы два метода формализованной оценки ПФА лиц, работающих с вредными и опасными производственными факторами, разработанные специалистами ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И.Бурназяна ФМБА России. К базовым показателям относится комплекс физиологических, психических и психофизиологических профессионально важных качеств работника. Методом экспертных оценок характеризовали выраженность ряда профессионально важных качеств, влияющих на уровень ПФА: поведение в сложной производственной ситуации, преобладающее настроение, формы проявления эмоций в производственных ситуациях, уровень здоровья [2]. Экспертами выступали непосредственные руководители работников, члены Комиссии по контролю биобезопасности противочумных институтов.

Работников, давших добровольное согласие, параллельно обследовали с помощью аппаратно-программного комплекса «АПК ПФС-КОНТРОЛЬ» (АПК) [6]. Программное обеспечение разработано в ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И.Бурназяна ФМБА России и любезно предоставлено в рамках договора о научном сотрудничестве для проведения обследования специалистов, допускаемых к работам с ПБА, с целью выявления лиц с нарушениями в функционировании регуляторных систем организма, нуждающихся в реабилитации, и оценки ее эффективности. В основу обследования заложены валидные методики, позволяющие оценить: *психофизиологическое состояние* («Простая зрительно-моторная реакция», «Сложная зрительно-моторная реакция»; «Реакции на движущийся объект»); *физиологическое состояние* (вариабельность сердечного ритма, теппинг- и тремор-тесты, показатели артериального давления в соответствии с возрастом, антропометрическими данными (рост, вес)); *психическое состояние* (психодиагностические тесты «Методика многостороннего исследования личности», «16 личностных факторов Кеттелла», «Методика оценки уровня субъективного контроля», «Прогрессивные матрицы Равена»). Полученные результаты оценивали на базе классификации функциональных состояний организма человека, предложенной Р.М. Баевским [9].

АПК имеет Регистрационное удостоверение Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития как изделие медицинского назначения, разрешенное к производству и применению на территории Российской Федерации (№ ФСР 2011/10759 от 06.05.2011) и Сертификат соответствия № 0820034 Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии.

Результаты и обсуждение

Системный подход к оценке уровня ПФА разработан под руководством доктора биологических наук, профессора Щепланова В.Ю. и доктора биологических наук Боброва А.Ф. Предложенную методологию и методики около 30 лет используют при предварительных, периодических и предсменных обследованиях работников организаций, осуществляющих деятельность с опасными и вредными производственными факторами, а именно, организаций Росатома,

Таблица 1. Исходные показатели интегрального фактора «базовые психофизиологические качества» (ИФ₄)

№ п/п	Исходные показатели	Выраженность оцениваемого качества	Баллы
1	Поведение в сложной производственной ситуации (q1)	Быстро и адекватно ориентируется и активно действует в ситуации	1
		Не стремится принимать активное участие	2
		Уклоняется от участия в разрешении ситуации	3
2	Преобладающее настроение (q2)	Адекватное оптимистическое настроение	1
		Отмечаются периоды неадекватного (повышенного или сниженного) настроения	2
		Часты периоды неадекватного настроения	3
3	Эмоции (q3)	Эмоциональные проявления адекватны производственной ситуации	1
		Отмечаются случаи неадекватных эмоциональных проявлений	2
		Эмоциональные реакции часто неадекватны производственной ситуации	3
4	Состояние здоровья (q4)	Хорошее (не влияет на работу)	1
		Среднее (состояние здоровья может сказаться на успешности выполнения своих служебных обязанностей)	2
		Плохое (состояние здоровья затрудняет выполнение служебных обязанностей)	3

Таблица 2. Значения интегрального фактора в выделенных группах

Интегральный фактор	Группы			
	ВУ_ИФ4	СУ_ИФ4	СНУ_ИФ4	НУ_ИФ4
ИФ4, в баллах (<i>M ± m</i>)	54,27 ± 0,15	49,20 ± 0,92	44,37 ± 1,69	24,03 ± 2,97
Число наблюдений, %	55,8	25,2	13,5	5,5

M – среднее арифметическое значение интегрального фактора, в баллах; *m* – стандартные квадратичные отклонения среднего значения для интегральных факторов в каждой из указанных групп.

МЧС, химической и энергетической промышленности, транспортной отрасли (авиакомпания, метрополитен) [2].

Экспертную оценку проводили с помощью Анкеты для характеристики профессиональной адаптации работника [2]. Формализация результатов анкетирования позволила получить количественные показатели четырех интегральных факторов (ИФ₁₋₄), одним из которых является выраженность «базовых психофизиологических качеств», влияющих на уровень ПФА (табл. 1).

Ответы экспертов переводили в соответствующие баллы и рассчитывали интегральный показатель для каждого работника по следующей формуле:

$$ИФ4 = 79,36 - 0,12 \times q_1 - 11,30 \times q_2 - 13,23 \times q_3 - 0,093 \times q_4, (1)$$
 где q_{1-4} – значения в баллах ответа эксперта на соответствующий вопрос; абсолютные числовые значения – константы.

Константы получены в результате применения факторного анализа и пошагового регрессионного анализа при исследовании репрезентативного массива данных – 274 анкеты, заполненные в 2012 г. на работников ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». В процессе накопления данных возможно уточнение констант. Максимальное значение соответствует 65 баллам, минимальное – 5 баллам.

Исследование количественных значений интегрального фактора с помощью кластерного анализа выявило разделение работников на 4 группы: высокий уровень (ВУ_ИФ4), средний (СУ_ИФ4), сниженный (СНУ_ИФ4) и низкий (НУ_ИФ4) (табл. 2).

Средняя точность распределения по группам составила 93,8%.

В результате из 274 обследованных эксперты оценили 55,84% работников как имеющих высокий уровень ПФА, 25,2% – средний, 13,5% – сниженный, 5,46% – низкий.

В 2016 г. апробация методики экспертной оценки проведена в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», «Ростовский-на-Дону НИПЧИ», «Иркутский НИПЧИ Сибири и Дальнего Востока», «Волгоградский НИПЧИ». Экспертами были заполнены анкеты на 302 специалистов, имеющих допуск к различным

видам работ с ПБА I–II групп. В итоге обследуемые были разделены на 4 группы в соответствии с уровнем ПФА. Высокий уровень ПФА был установлен для 82,5% работников, средний – для 3,6%, сниженный – для 13,2% и низкий – для 0,7%.

Вместе с тем показатель ИФ₄ учитывает ограниченный перечень качеств работника и для характеристики его профессиональной адаптации предназначен к использованию в комплексе с другими интегральными факторами – профессиональная подготовленность (ИФ₁), профессиональная успешность (ИФ₂), базовые личностные качества (ИФ₃). Кроме того, работа эксперта не лишена субъективизма. Следовательно, для повышения объективности и информативности оценки ПФА целесообразно применять дополнительные методики на этапах предварительных и периодических (ежегодных) медико-психофизиологических обследований персонала, а также перед началом рабочего дня.

Такие возможности предоставляет аппаратно-программный комплекс «АПК ПФС-КОНТРОЛЬ» [6]. Обследование с его помощью не только дает возможность охарактеризовать профессионально важные личностные свойства, степень адаптированности обследуемого, степень субъективной склонности исходить при оценке ситуации из внутренних критериев, интеллектуальный уровень личности, способность к обучению на основе обобщения собственного опыта, но также позволяет определить тип нервной системы, исследовать работоспособность, устойчивость и выносливость к продолжительным раздражителям; скорость принятия решения при выборе альтернатив, скорость восприятия, анализа, переработки информации и принятия решения; точность реагирования, склонность к риску, уравновешенность процессов возбуждения и торможения центральной нервной систем; оценивать состояние механизмов регуляции физиологических функций в организме человека, в частности, общую активность регуляторных механизмов, нейрогуморальную регуляцию сердца, соотношение между функционированием симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы.

Таблица 3. Классификация функциональных состояний по Р.М.Баевскому [9]

«Светофор» состояния	Донозологическая диагностика	Степень напряжения регуляторных систем
Зеленый	Физиологическая норма	1. Оптимальный уровень 2. Нормальный уровень 3. Умеренное функциональное напряжение
Желтый	Донозологические состояния	4. Выраженное функциональное напряжение 5. Резко выраженное функциональное напряжение 6. Перенапряжение регуляторных механизмов
	Преморбидные состояния	7. Резко выраженное перенапряжение регуляторных механизмов
Красный	Срыв адаптации	8. Истощение регуляторных систем
		9. Резко выраженное истощение регуляторных систем 10. Полом (срыв) механизмов регуляции

Характерной особенностью большинства методик, включенных в АПК, является неспецифичность по отношению к нозологическим формам болезней и высокая чувствительность к самым разнообразным внутренним и внешним воздействиям на организм человека. Полученные результаты оценивают с помощью системы поддержки принятия решений методом анализа иерархий на базе классификации функциональных состояний организма человека, предложенной Р.М.Баевским (табл. 3).

Заключение по данным, полученным с помощью АПК, свидетельствовало, что психофизиологические противопоказания к работам с опасными факторами не были выявлены у 44% (рисунок).

В 18% случаев психофизиологические противопоказания были обусловлены показателями физиологического состояния, в 8% случаев – психофизиологическими показателями, в 18% случаев – результатами психодиагностического обследования, в 12% случаев – комбинацией психофизиологических показателей и результатов психодиагностических тестов.

Таким образом, методики АПК позволили объективно и более детально, по сравнению с экспертной оценкой, рассмотреть психофизиологическое состояние работника, оценить его в комплексе с психическими и физиологическими особенностями организма; выявить лиц со снижением уровня ПФА, являющегося индикатором нарушения функционирования регуляторных систем организма.

Однако для окончательного заключения формализованное обобщение результатов обследования необходимо сопоставлять с данными о наличии прямых или косвенных признаков психофизиологических отклонений (существенное снижение профессиональной работоспособности; признаки повышенной утомляемости; не имеющие клинической сим-

птоматики психофизиологические и соматические расстройства; выраженная степень когнитивных и мнестико-интеллектуальных нарушений; отклонения познавательных процессов и (или) эмоционально-волевой сферы). Подобная информация накапливается в процессе работы с персоналом специалистов, имеющих профессиональную подготовку по «клинической психологии». В настоящее время в штате учреждений, осуществляющих деятельность с ПБА I–II групп, подобные специалисты отсутствуют.

Полученная при апробации методик информация позволяет планировать и осуществлять обоснованный индивидуальный подход к мониторингу и определению мероприятий для коррекции профессионального здоровья работника, оценке их эффективности, а следовательно, к профилактике снижения НПД специалиста в процессе трудовой деятельности. А именно:

- предварительное психофизиологическое обследование при поступлении на работу в комплексе регламентированного медицинского осмотра с целью оценки соответствия состояния здоровья работника должностным обязанностям, а также профилактики и раннего выявления профессионально значимых заболеваний;

- периодические психофизиологические обследования, проводимые в целях выявления лиц с нарушениями функционального состояния и признаками психофизиологической дезадаптации, которые могут свидетельствовать о наличии психофизиологических противопоказаний для продолжения работы с опасными факторами и веществами.

Время работы с АПК в полном объеме составляет около 3 ч, большая часть которого затрачивается на психологические тесты. Данная задача решается в рамках предварительного и ежегодного периодического обследований. Вместе с тем обследование психофизиологического и физиологического состояния позволяет ежедневно оперативно (в течение 10–15 минут) оценивать работника перед началом смены и давать заключение о возможности допуска к выполнению работ с ПБА.

Заключение

Апробированные методы формализованной оценки позволяют получить объективные и информативные данные о ПФА работника с целью мониторинга. Применение «АПК ПФС-КОНТРОЛЬ» способствует выявлению напряжения механизмов адаптации организма на донозологическом и преморбидном уровнях, то есть до появления симптомов болезни. Установление причины данного процесса и своевременное проведение мероприятий для коррекции профессионального

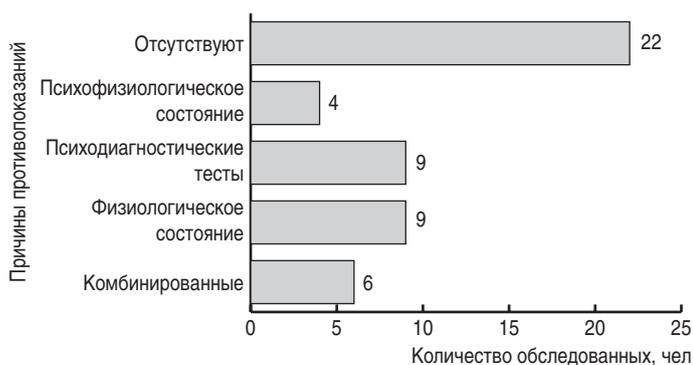


Рисунок. Основания для заключения о наличии противопоказаний к работам с опасными производственными факторами.

здоровья направлены на обеспечение социально приемлемого уровня надежности профессиональной деятельности специалиста, а следовательно, биологической безопасности функционирования учреждения. В связи с этим целесообразно дополнить регламентированный комплексный анализ профессионального здоровья работников, допускаемых к манипуляциям с ПБА I–II групп, использованием метода экспертных оценок в комплексе с «АПК ПФС-КОНТРОЛЬ».

Для реализации системного подхода к оценке ПФА и разработке реабилитационных мероприятий необходимо привлечение врача организации, осуществляющей деятельность с возбудителями ООИ, и специалистов по клинической психологии.

Информация о финансировании

Данная работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Литература

1. Федеральный закон от 21.07.1997 №116-ФЗ «О промышленной безопасности опасных производственных объектов». Сборник основных нормативных и правовых актов по вопросам ГО и ЧС. М.: Военные знания; 2001, с. 60-6. Доступно по: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_15234/
2. Бобров АФ, Мартенс ВК, Ипатов ПП, Сорокин АВ, Басов ВИ. Профессиональная надежность персонала АЭС: Концепция и технология количественной оценки, практика управления. Саратов: Изд-во Саратов. ун-т; 2003, 232 с.
3. Малукова ТА, Бобров АФ, Щепланов ВЮ, Тихомирова ЛА, Бойко АВ, Топорков АВ. Методологические основы оценки надежности профессиональной деятельности персонала, работающего с микроорганизмами I–II групп патогенности. Проблемы особо опасных инфекций. 2010;1(103):37-43.
4. Николаевский ЕН. Психофизиологическая адаптация как важное звено адаптации организации. Инновационная наука. 2016;9:338-40.
5. Березин ФБ. Психическая и психофизиологическая адаптация человека. Л: Наука; 1988, 272 с.
6. Бобров АФ, Бушманов АЮ, Седин ВИ, Щепланов ВЮ. Системная оценка результатов психофизиологических обследований. Медицина экстремальных ситуаций. 2015;3(53):13-19.
7. Дружилов С.А. Становление профессионализма человека как реализация индивидуального ресурса профессионального развития. Новокузнецк: Изд-во ИПК; 2002, 242 с.

8. Управление персоналом. Учебник для вузов. Под ред. Т.Ю.Базарова, Б.Л.Еремина. М.: ЮНИТИ; 2002, 560 с.
9. Баевский РМ. Теоретические и прикладные аспекты оценки и прогнозирования функционального состояния организма при действии факторов длительного космического полета. Актовая речь на заседании Ученого Совета ГНЦ РФ ИМБП РАН 20 октября 2005. Доступно по: http://www.imbp.ru/WebPages/win1251/Science/UchSov/Docl/2005/Baevski_speech.html

References

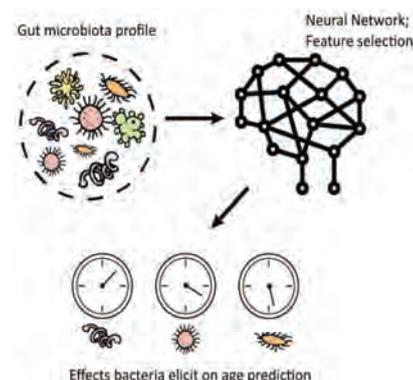
1. On industrial safety of hazardous production facilities. Federal Law of 21.07.1997 No. 116-FL. Collection of main regulatory and legal acts on civil defense and emergency situations. Moscow: "Military Knowledge" Publ.; 2001, p. 60-6. Available at: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_15234/ (In Russian).
2. Bobrov AF, Martens VK, Ipatov PP, Sorokin AV, Basov VI. Professional'naya nadezhnost' personala AES: Konceptiya i tekhnologiya kolichestvennoy ocenki, praktika upravleniya [Professional reliability of NPP personnel: Concept and technology of quantitative assessment, management practice]. Saratov, 2003, 232 p. (In Russian).
3. Malyukova TA, Bobrov AF, Scheblanov VYu, Tikhomirova LA, Boiko AV, Toporkov AV. Methodological Background of the Assessment of Reliability of the Professional Activity of the Personnel Working with PBA of Pathogenicity Groups I-II. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2010;1(103):37-43. (In Russian).
4. Nikolaevskij EN. [Psychophysiological adaptation as an important link in the adaptation of an organization]. Innovacionnaya nauka. 2016;9:338-40. (In Russian).
5. Berezin FB. Psihicheskaya i psihofiziologicheskaya adaptaciya cheloveka [Mental and psychophysiological human adaptation]. L: "Nauka" Publ., 1988, 272 p. (In Russian).
6. Bobrov AF, Bushmanov AYu, Sedin VI, Shcheblanov VYu. Systemic assessment of the results of psychophysiological examinations. Medicine of Extreme Situations. 2015;3(53):13-9. (In Russian).
7. Druzhilov SA. The formation of human professionalism as the realization of an individual resource of professional development. Novokuznetsk: Publishing house IPK; 2002, 242 p. (In Russian).
8. Human Resource Management. Textbook for universities. Edited by T.Yu.Bazarova, B.L.Eremina. Moscow: "UNITY" Publ.; 2002, 560 p. (In Russian).
9. Baevskij RM. Theoretical and applied aspects of assessing and predicting the functional state of the body under the action of factors of a long space flight. Actual speech at a meeting of the Academic Council of the State Research Center of the Russian Federation, IMBP RAS October 20, 2005. Available at: http://www.imbp.ru/WebPages/win1251/Science/UchSov/Docl/2005/Baevski_speech.html 9 (In Russian).

НОВОСТИ НАУКИ

Микробиом человека и его возраст

Микробиом (совокупность генов микрофлоры) кишечника человека – сложная экосистема, которая тесно связана с организмом хозяина. В результате изучения 1663 образцов микробиома от 1165 здоровых людей обнаружены изменения в микробиоме человека с возрастом, что позволило создать «микробиомные часы» человека, позволяющие с точностью 4 года оценивать его возраст. Определены два перечня из 95 кишечных биомаркеров старения человека, которые можно сократить до 39 таксонов, которые предоставляют наибольшую информацию о старении их хозяина. В целом показано, что (а) микробиологические профили могут быть использованы для прогнозирования возраста человека; и (б) микробные особенности, выбранные моделями, связаны с возрастом.

Galkin F. et al. Human microbiome aging clocks based on deep learning and tandem of permutation feature importance and accumulated local effects. bioRxiv. 2018.



Внутривидовая дифференциация *Yersinia pestis*: от фенотипа к полногеномному секвенированию

А.С.Вагайская, А.С.Трунякова, С.В.Дентовская

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

Для внутривидовой дифференциации штаммов *Yersinia pestis* с разной эффективностью использовали множество методов. В настоящее время молекулярно-генетические подходы все чаще заменяют традиционные методы, основанные на оценке фенотипических свойств возбудителя чумы. В данном обзоре особое внимание уделено методам типирования чумного микроба, отвечающим требованиям популяционной генетики, филогеографии и молекулярной эпидемиологии. Описанные подходы оцениваются с точки зрения стоимости, сложности выполнения, межлабораторной воспроизводимости результатов, дискриминационной способности, полезности для решения различных вопросов исследования и текущей применимости вследствие появления метода полногеномного секвенирования.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, внутривидовая дифференциация, RFLP, IS-элементы, DFR, LCB, MLVA, CRISPR, SNP, полногеномное секвенирование

Для цитирования: Вагайская А.С., Трунякова А.С., Дентовская С.В. Внутривидовая дифференциация *Yersinia pestis*: от фенотипа к полногеномному секвенированию. Бактериология. 2019; 4(2): 42–54. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-42-54

Intraspecific differentiation of *Yersinia pestis*: from the phenotype to the full genome sequencing

A.S.Vagayskaya, A.S.Trunyakova, S.V.Dentovskaya

State Research Center for applied microbiology and biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Russian Federation

Many methods have been used with different efficiency for intraspecific differentiation of *Yersinia pestis* strains. Currently, molecular genetic approaches are increasingly replacing traditional methods based on the assessment of the phenotypic properties. In this review, special attention is paid to the methods of *Y. pestis* typing that meet the requirements of population genetics, phylogeography and molecular epidemiology. The described approaches are evaluated in terms of expense, difficulty, interlaboratory reproducibility, discriminatory power, usefulness for solving various research issues and current applicability in light of the emergence of the whole-genome sequencing.

Keywords: *Yersinia pestis*, intraspecific differentiation, RFLP, ISelement, DFR, LCB, MLVA, CRISPR, SNP, whole genome sequence

For citation: Vagayskaya A.S., Trunyakova A.S., Dentovskaya S.V. Intraspecific differentiation of *Yersinia pestis*: from the phenotype to the full genome sequencing. Bacteriology. 2019; 4(2): 42–54. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-42-54

Чума – одно из самых смертоносных заболеваний в истории человечества, в ходе трех пандемий которого погибли сотни миллионов людей [1]. Несмотря на то что на современном этапе меры, предпринимаемые общественным здравоохранением (улучшение гигиены, использование антибиотиков и инсектицидов и т.д.), позволили эффективнее бороться с чумой, в некоторых частях земного шара сохраняется потенциальная угроза возникновения и распро-

странения вспышек инфекции [1]. Чумной микроб может быть использован как агент биотерроризма, а обнаружение штаммов возбудителя чумы с множественной антибиотикоустойчивостью только увеличивает угрозу человечеству [2].

Считается, что *Y. pestis* – возбудитель чумы – образовался путем дивергенции от *Yersinia pseudotuberculosis* примерно 15 000–20 000 лет назад [3]. Относительно недавнее отделение привело к отсутствию значительного генетического

Для корреспонденции:

Дентовская Светлана Владимировна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

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

Телефон: (4967) 36-0112

E-mail: dentovskaya@obolensk.org

Статья поступила 30.03.2019 г., принята к печати 27.06.2019 г.

For correspondence:

Svetlana V. Dentovskaya, MD, PhD, DSc, major researcher of laboratory for plague microbiology State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

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

Phone: (4967) 36-0112

E-mail: dentovskaya@obolensk.org

The article was received 30.03.2019, accepted for publication 27.06.2019

разнообразия у штаммов чумного микроба. Из-за этого многие методы внутривидовой дифференциации, применяемые для других микроорганизмов, практически не используют при молекулярном типировании чумного микроба. Поиск различий в генетическом строении усложняет тот факт, что, несмотря на то, что природные очаги инфекции разбросаны по всему миру, наибольшее географическое распространение заболевания явилось результатом третьей пандемии, начавшейся в середине XIX в. в провинции Юньнань Китая. Поэтому штаммы чумного микроба, выделяемые во вновь сформировавшихся природных очагах, в том числе в Северной и Южной Америке, отличаются ограниченным биологическим разнообразием [3]. В противоположность этому штаммы *Y. pestis* из регионов Центральной и Восточной Азии, особенно Китая, СНГ и Монголии, обладают значительным полиморфизмом и отличаются по спектру чувствительных к ним млекопитающих (избирательной вирулентности), ферментативной активности, степени аутокотрофности и другим признакам [1, 4–6].

Первоначально для внутривидовой дифференциации штаммов чумного микроба использовали методы, основанные на изучении фенотипических характеристик, серотипирование, фаготипирование и плазмидный анализ. Позднее появились молекулярно-генетические методы, основанные на детекции фрагментов ДНК *Y. pestis*: определение полиморфизма длин рестрикционных фрагментов – RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism), IS-типирование (IS – Insertion Sequence), анализ отличающихся участков ДНК – DFR-типирование (Different Region), ПЦП-анализ случайно амплифицированной полиморфной ДНК – RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA), ПЦП с праймерами на повторяющиеся экстрагенные палиндромы – REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic), VNTR-анализ – анализ варибельного числа tandemных повторов (VNTR – Variable-Number Tandem Repeat) [7]. В последующем появились методы генотипирования, основанные на секвенировании фрагментов ДНК: определение полиморфизма рибосомальных рРНК, мультилокусный анализ варибельных tandemных повторов – MLVA (Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeats Analysis) [8, 9], CRISPR-типирование (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – кластеризованные короткие палиндромные повторы, разделенные спейсерами) [10], SNP-типирование – анализ полиморфизма единичных нуклеотидов (Single-Nucleotide Polymorphism) [11], а затем и полногеномное секвенирование [12].

Ранние методы типирования

Фенотипические методы. Самая ранняя и наиболее широко используемая схема типирования *Y. pestis* включает в себя изучение двух фенотипических свойств: способность штаммов к ферментации глицерина (*glpD*+) и восстановлению нитратов (*napA*), делящая штаммы чумного микроба на три биовара: *antiqua* (*glpD*+, *napA*+), *medievalis* (*glpD*+, *napA*–) и *orientalis* (*glpD*–, *napA*+) [13, 14]. R.Devignat [15] и В.Туманский [16] впервые использовали способность к ферментации глицерина, нитрификации и денитрификации для подразделения штаммов *Y. pestis* на три внутривидовые группы, предположительно явившиеся причиной трех пандемий: «Юстиниановой чумы», «Черной смерти» и третьей

пандемии соответственно. Кроме этого, для деления штаммов *Y. pestis* из Китая и СНГ, где уровень генетического разнообразия чумного микроба значительно выше, чем где бы то ни было в мире, оценивают способность к ферментации различных сахаров (рамноза, арабиноза, мелибиоза, мальтоза, манноза и трегалоза), потребность в дополнительных факторах роста (лейцин, метионин, аргинин, тиамин, цистеин, фенилаланин, треонин и тирозин), чувствительность к пестицину, фибринолитическую и плазмокоагуляционную активность, а также степень вирулентности для морских свинок. Набор из фенотипических признаков используют для деления изолятов *Y. pestis* из стран СНГ и Монголии на основной подвид *Y. pestis* subsp. *pestis*, в который входят штаммы, обладающие «универсальной» вирулентностью для человека и животных, а также на несколько неосновных подвидов: *altaica*, *angola*, *caucasica*, *hissarica*, *talassica*, *ulegeica*, авирулентных для человека [13]. Однако сообщают о единичных случаях заражения людей бактериями неосновных подвидов, не передающихся от человека к человеку [4]. Аналогичную схему фенотипической внутривидовой дифференцировки на различные экотипы использовали Zhou et al., [17] для штаммов *Y. pestis* из Китая, которые предложили биовар *microtus* (*glpD*+, *napA*–, *araC*–), штаммы которого, в отличие от биоваров основного подвида, неспособны к ферментации арабинозы [18]. Новый вариант внутривидового деления возбудителя чумы, соответствующий правилам Международного кодекса номенклатуры бактерий, был предложен М.Е.Платоновым и соавт. [7]. Эта классификационная схема содержит всего два подвида *pestis* и *microti*, которые, в свою очередь, делятся на четыре (*antiqua*, *medievalis* и *orientalis*, *intermedium*) и восемь (*caucasica*, *angola*, *talassica*, *qinghaiensis*, *xilingolensis*, *altaica*, *hissarica* и *ulegeica*) биоваров, соответственно. Кроме фенотипических характеристик и вирулентности для человека и морских свинок, различные внутривидовые группы чумного микроба отличаются по географическому ареалу выделения и основному хозяину [13, 17, 19].

Известно, что фенотипические свойства микроорганизмов характеризуются нестабильностью и могут подвергаться конвергентной эволюции. Биоварная принадлежность штаммов может быть ошибочно определена из-за независимых мутаций, вызывающих появление нового фенотипа [7, 13], и, наоборот, штаммы из разных биоваров могут обладать одинаковыми фенотипическими свойствами.

Несмотря на появление новых молекулярно-генетических подходов, фенотипические методы продолжают использовать как средство идентификации изолятов *Y. pestis* и определения их биоварной принадлежности. Было показано, что коммерческая система API20E® эффективна для идентификации монгольских штаммов *Y. pestis* [20], но не для штаммов, выделенных на территории Республики Грузия [21]. Классические микробиологические методы до настоящего времени используют для внутривидовой дифференциации штаммов чумного микроба на подвиды и биовары [20, 21]. Оценку фенотипических свойств штаммов *Y. pestis* в качестве дополнения к методам генотипирования успешно применили при расследовании вспышек чумы в Алжире и Ливии [22]. Напротив, попытки использовать данные методы для дифференциации близкородственных

штаммов, например, биовара *orientalis* из природных очагов чумы в Бразилии ожидаемо оказались безуспешными [23, 24].

Серотипирование и фаготипирование. Серотипирование и типирование с использованием бактериофагов, как правило, не пригодны для дифференциации штаммов *Y. pestis* из-за высокого уровня гомологичности по этим признакам. Действительно, обычно считают, что все штаммы *Y. pestis* принадлежат к одному серотипу и одному фаготипу.

Плазмидный анализ. Штаммы *Y. pestis* могут характеризоваться различным плазмидным составом. Большинство штаммов чумного микроба обладает тремя плазмидами: pPCP1 (pPst,9,5 т.п.н.), pCD1 (pCad или pYV,70-75 т.п.н.) и pMT1 (pFra,100-110 т.п.н.). Иногда штаммы возбудителя чумы несут криптические плазмиды [1, 13, 25], которые могут представлять собой варианты трех основных плазмид чумного микроба (т.е. содержат инсерции-делеции, являются мультимерными или рекомбинантными вариантами этих плазмид) или могут быть совершенно новыми плазмидами [1, 13, 25, 26]. Для дифференциации штаммов *Y. pestis*, особенно штаммов, выделенных на территории природных очагов чумы стран СНГ и Китая, использовали различия в количестве и размере плазмид [13] и выявили 20 или более различных плазмидных профилей [7] или плазмидоваров [13], которые можно соотнести с местом выделения и фенотипическими характеристиками штаммов [13, 27]. Однако ограниченное количество обнаруженных плазмидоваров снижает диагностическую ценность данного соответствия. Подобно фенотипическим методам, анализ плазмидного состава, как правило, малоэффективен для дифференцировки близкородственных штаммов из одной географической области, как, например, было показано для изолятов из Бразилии [23, 24].

Методы генотипирования, основанные на детекции фрагментов ДНК

Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов.

Методы генотипирования *Y. pestis*, основанные на изучении полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, включают в себя риботипирование, гель-электрофорез в пульсирующем поле, RFLP-анализ, основанный на изучении расположения в геноме IS-элементов.

Риботипирование. У представителей различных биоваров *Y. pestis* опероны рПНК представлены различным количеством копий [7, 14]. Для проведения риботипирования геномную ДНК *Y. pestis* расщепляют рестриктазами EcoRI и EcoRV, далее полученные фрагменты разделяют с помощью гель-электрофореза и проводят Саузерн-блот с использованием зонда 16S-23S рПНК [28]. Показано, что риботипирование обладает ограниченной дискриминирующей способностью. При исследовании данным методом 70 штаммов *Y. pestis*, собранных в течение 72 лет на пяти континентах, выявили только 16 риботипов, при этом 65,7% проанализированных штаммов относилось только к двум риботипам, тогда как в остальные 14 входило не более чем по 3 штамма [28]. Было показано, что риботипы можно соотнести с подвидовой/биоварной принадлежностью штаммов чумного микроба [7, 28, 29] и их PFGE-профилями [30]. Метод риботипирования недавно использовали для доказатель-

ства отсутствия взаимосвязи между вспышками чумы в Алжире и Ливии в 2003 и 2009 гг., вызванных штаммами двух разных биоваров [22]. Аналогичным образом данный метод также успешно использовали для дифференциации штаммов *Y. pestis* из различных природных очагов чумы Китая [31]. Однако из-за низкой дискриминирующей способности и трудоемкости выполнения риботипирование применяли для изучения генетического разнообразия штаммов *Y. pestis* относительно недолго.

Оценка профилей фрагментов ДНК с помощью гель-электрофореза в пульсирующем поле. При проведении PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis – гель-электрофорез в пульсирующем поле) геномную ДНК расщепляют различными редкощепляющими рестриктазами и разделяют полученные фрагменты в геле с использованием переменного электрического поля. Этот метод позволяет анализировать геномы отдельных штаммов путем сравнения их RFLP-профилей. При проведении PFGE-анализа штаммов *Y. pestis* разными группами исследователей получали противоречивые результаты. Первоначально PFGE небольшой панели штаммов возбудителя чумы, расщепленных с использованием рестриктаз SpeI или I-CeuI, выявил ограниченное количество пульсотипов, которое коррелировало с биоварной принадлежностью [32, 33]. В другом исследовании показали корреляцию между риботипами и пульсотипами [30]. В дальнейшем установили, что разные колонии одного и того же штамма могут демонстрировать принадлежность к разным пульсотипам, и предположили, что PFGE не подходит для сравнения штаммов *Y. pestis* [28]. Однако в последующих исследованиях не только удалось получить адекватную дифференциацию штаммов чумного микроба, считавшихся гомогенными при тестировании с использованием других молекулярно-генетических методов, например, риботипирования [34–36], но также показать, что пульсотипы оставались неизменными в течение нескольких лабораторных пассажей [34, 36]. Путем PFGE авторы смогли подразделить 17 и 37 штаммов, принадлежащих к риботипу В, из природных очагов Мадагаскара и США [35, 36], на 8 и 26 пульсотипов соответственно, а 22 штамма из Бразилии – на 19 пульсотипов [34]. Однако исследователи не выявили какой-либо сильной корреляции с географическим ареалом выделения штаммов [34–36]. Напротив, изучение при помощи метода PFGE штаммов из Республики Грузия, соседних стран СНГ и провинции Юньнань в Китае выявило корреляцию пульсотипа с регионом выделения [21, 37, 38], вероятно, из-за большей эволюционной дистанции между штаммами, принадлежащими к нескольким внутривидовым группам, и ограниченного географического ареала их распространения. Также использование метода PFGE позволило установить, что причиной вспышек чумы в соседних Алжире и Ливии в 2003 и 2009 гг. соответственно были штаммы двух разных биоваров. В этом же исследовании обнаружили существование небольших различий в пульсотипах изолятов из Алжира в отличие от ливийских штаммов [22]. Таким образом, PFGE обеспечивает определенный уровень дискриминации между штаммами *Y. pestis*. Однако трудоемкость метода и сложности в сравнении результатов между разными лабораториями привели к тому, что он был заменен на более современные методы типирования чумного микроба.

Методы типирования, основанные на детекции IS-элементов. Геномы *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* содержат четыре типа IS-элементов. В наибольшем количестве копий в геноме *Y. pestis* обнаружен IS100 (75 копий у штамма Antiqua, 30–44 копий у штаммов CO92, KIM, Nepal 516 и 91001). IS1541 в геноме чумного микроба представлен 47–67 копиями; IS285 – 19–25 копиями; а IS1661 – 8–10 копиями [39–42]. Различия в числе и расположении этих генетических элементов на хромосоме и плаزمиде используют для генотипирования штаммов чумного микроба путем риботипирования, PFGE и IS-типирования [7, 14]. Для *Y. pestis* разработано два метода генотипирования с использованием последовательности IS-элементов. Первый метод представляет собой вариант RFLP, где в качестве зонда используется последовательность IS-элемента, а не рПНК, как в риботипировании. В одном из исследований генотипирование изолятов *Y. pestis* проводили при помощи RFLP с последующей гибридизацией полученных фрагментов ДНК с зондом к IS100-элементу, который представлен хотя бы одной копией на каждой из трех плазмид чумного микроба, а также несколькими копиями хромосомной локализации [43]. Секвенирование инсерционной последовательности IS100 провели А.А.Филиппов et al. [44, 45], а затем использовали в сочетании с впервые обнаруженным IS285 для оценки геномного полиморфизма и установления филогенетических взаимоотношений между штаммами чумного микроба [46]. Предложенный метод, сочетающий RFLP с Саузерн-блотом с IS100 и IS285, приобрел популярность для всесторонней характеристики коллекций *Y. pestis*. Наконец, у возбудителя чумы была обнаружена третья инсерционная последовательность (IS1541), которая нарушает ген *inv*, кодирующий инвазин [47]. Сейчас известно, что данный элемент имеет много копий внутри генома чумного микроба, и также может быть использован в качестве ДНК-зонда для RFLP-анализа при геномной дактилоскопии [47, 48]. Местоположения IS1541 в геноме чумного микроба и гены, фланкирующие вставки данной инсерционной последовательности, были определены для штамма *Y. pestis* bv. *orientalis* 6/69 M [48]. Для того чтобы проверить, фланкируют ли те же гены IS1541, авторы использовали пять неродственных между собой штаммов *Y. pestis*, принадлежащих к bv. *orientalis* и bv. *medievalis*, различных риботипов и моделей гибридизации с IS1541, которые были выделены в течение разных временных периодов в разных географических областях. Все штаммы bv. *orientalis* имели вставки IS1541 в одних и тех же местах генома (девять фланкирующих генов были определены), при этом у штаммов bv. *medievalis* одна из вставок отсутствовала. Данные результаты подтвердили, что позиции вставок IS1541 в данных локусах генома представляют собой стабильные события, и подвижность данного элемента внутри генома *Y. pestis* ограничена [48].

IS-RFLP анализ ДНК 49 различных штаммов *Y. pestis*, обработанных рестриктазой EcoRI, с использованием в качестве зонда IS100 элемента, обладал хорошей дискриминационной способностью, позволившей разделить изоляты до уровня биоваров [49]. Также было показано, что при помощи метода IS-RFLP можно различить близкородственные штаммы. Параллельный анализ ДНК 37 штаммов *Y. pestis* из США, предварительно обработанных рестриктазой HindIII

с зондом для IS100 и рестриктазой EcoRI с зондом для IS285, выявил 16 и 4 IS-RFLP типа соответственно, хотя в каждом из анализов большинство штаммов принадлежало к одному типу [36]. Более высокая дискриминирующая способность (59 типов для 61 штамма) была достигнута в методе, названном 3 IS-RLFP, использующем две различные рестриктазы (EcoRI и HindIII) и зонды к трем IS-элементам (IS100, IS285 и IS1541). Метод позволил кластеризовать штаммы в соответствии с биоварной принадлежностью и географическим происхождением, за исключением некоторых штаммов биовара *orientalis*, выделенных на Мадагаскаре [50]. Метод с использованием зондов для двух IS-элементов (IS100 и IS1541), обозначенный 2 IS-RFLP, использовали при расследовании вспышек чумы в Алжире и Ливии. Результаты 2 IS-RFLP продемонстрировали, что причиной вспышек стали штаммы двух различных биоваров, а также метод выявил некоторые различия среди алжирских, но не ливийских штаммов [26]. Трудоемкость метода IS-RFLP помешала его широкому применению на практике и привела к замене более современными подходами.

Второй подход основан на использовании ПЦР, мишенью которой являются известные сайты встраивания IS-элемента в геноме. При этом нуклеотидная последовательность одного из праймеров комплементарна IS-элементу, а другой праймер является сайт-специфичным к локусу, фланкирующему IS-элемент. ПЦР с набором праймеров помогает определить, находится ли IS-элемент в конкретном месте генома. Набор из 27 пар праймеров, нацеленных на детекцию 16 вставок IS100 относительно генома штамма CO92, смог разделить 77 штаммов *Y. pestis* на 15 различных генотипов. Генотипы в основном коррелировали с биоварами, наблюдалась также небольшая географическая корреляция, особенно для штаммов биовара *orientalis* [51]. В другом исследовании определяли местоположение 11 сайтов встройки IS100 у 131 штамма чумного микроба. При этом штаммы разделялись на те же генетические линии, что и при использовании методов VNTR и SNP [3]. Интересно, что данный метод предоставил одно из первых молекулярных свидетельств генетической взаимосвязи между штаммами *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis* subsp. *microti* и *Y. pestis* subsp. *pestis* [14] и установил промежуточное положение изолятов subsp. *microti* между представителями *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* subsp. *pestis* [51]. Кроме того, данный метод впервые показал, что некоторые штаммы биоваров *medievalis* и *antiqua* действительно могут принадлежать к одной генетической группе [14, 51], что было подтверждено при использовании других методов генотипирования (sSNP, VNTR), идентифицирующих три основные филогенетические ветви *Y. pestis*. Однако дендрограмма, построенная на основании данных IS100-анализа, не всегда корректно отражала филогенез из-за горячих точек с высокой частотой внутригеномных перестроек, часто ведущих к гомоплазии. IS-типирование по сравнению с sSNP и VNTR не является идеальным методом для классификации и филогенетической реконструкции *Y. pestis* [3].

DFR-анализ. Для выявления различий в геномах *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, а также среди штаммов *Y. pestis* были использованы супрессионная вычитающая гибридизация – SSH (Suppression Subtractive Hybridization), типирова-

ние с использованием микроэзреев и сравнительный анализ полногеномного секвенса. При проведении SSH выявили область размером 41,7 т.п.н., специфичную для *Y. pestis*, последовательность которой затем использовали для разработки ПЦР-анализа [52]. В следующем проведенном исследовании обнаружили шесть геномных областей, названных дифференцирующими фрагментами, по наличию или отсутствию которых удалось выявить 12 DFR-типов для 78 различных штаммов *Y. pestis* [53]. Еще десять DFR были идентифицированы для небольшого набора штаммов при помощи типирования с помощью микроэзрея, специфичного для генов *Y. pestis* CO92 [54]. Анализ штаммов *Y. pestis* из Китая с использованием SSH и микроэзреев выявил 22 и 4 дифференцирующих фрагмента соответственно [8, 19]. При анализе 23 DFR 909 штаммов *Y. pestis* из Китая были поделены на 32 группы, названные геномоварами [9]. Позднее среди 3044 штаммов *Y. pestis* путем DFR-анализа 23 локусов выявили 52 геномовара [55]. Геномовары коррелировали с определенными экотипами и были специфичны для конкретных очагов чумы [9, 55]. Используя 23 DFR при изучении генетического разнообразия 275 штаммов, выделенных в 27 природных очагах чумы стран СНГ и Монголии, обнаружили 56 геномовара [7]. Кроме того, DFR-анализ использовали для изучения штаммов *Y. pestis*, связанных со вспышками чумы среди людей и/или выделенных в очагах чумы на территории Китая [56–60]. Отсутствие или наличие дифференцирующих фрагментов ДНК можно обнаружить, используя ПЦР и электрофорез для визуализации ее продуктов [8, 19]. Благодаря простоте выполнения и дешевизне, метод можно использовать в любой лаборатории. DFR-типирование штаммов возбудителя чумы позволяет дифференцировать штаммы до уровня подвидов, биоваров [7], а в случае со штаммами *Y. pestis* из Китая метод может быть использован для предварительного определения очаговой принадлежности [9]. Было также показано, что результаты кластеризации штаммов, полученные путем DFR-анализа, коррелируют с другими методами генотипирования при определении филогенетических отношений между основными группами *Y. pestis*. Однако DFR-анализ не обладает высокой дискриминирующей способностью в пределах основной группы штаммов [9], что несколько ограничивает его применение в популяционной генетике, филогеографии или молекулярной эпидемиологии.

LCB. Геномные перестройки характерны для штаммов всех биоваров *Y. pestis* [12, 28, 39, 41, 42, 61–65]. При исследовании геномов восьми штаммов *Y. pestis* Liang et al. [65] идентифицировали 61 большой сегмент ДНК, нуклеотидные последовательности которых были консервативны по содержанию и структуре, но демонстрировали значительную изменчивость в расположении и ориентации внутри генома. Авторы назвали эти последовательности локально коллинеарными блоками – LSB (Locally Collinear Blocks) и установили, что соединяющие блоки области точек разрыва состоят из IS-элементов и/или кластеров генов рPHK, которые отвечают за наблюдаемые перегруппировки. Liang et al. [66] разработали метод генотипирования для детекции фрагментов ДНК, связанных с перестройками LCB. Метод основан на ПЦР и агарозном гель-электрофорезе, а праймеры для обнаружения 12 возможных сайтов перестроек LCB были скон-

струированы вблизи и внутри границ данных фрагментов. Секвенирование регионов точек разрыва, содержащихся в ПЦР-продуктах, использовали для подтверждения способа соединения LCB. Данный метод позволил разделить 28 штаммов *Y. pestis* из пяти очагов чумы в Китае на 11 групп, коррелирующих с биоварной принадлежностью и географическим происхождением изолятов. Однако его пригодность для решения вопросов популяционной генетики, филогеографии или молекулярной эпидемиологии требует дальнейшего подтверждения.

ПЦР с произвольными праймерами. RAPD-ПЦР – метод генотипирования, который использует один или несколько произвольно выбранных праймеров, амплифицирующих случайные последовательности ДНК разной длины. Образованные фрагменты разделяют при помощи электрофореза, а после сравнивают полученные RAPD-фингерпринты изолятов. Данный метод может быть применен при проведении сравнительных исследований небольшого количества штаммов чумного микроба при отслеживании их распространения и выявлении вспышек инфекции. Однако обнаруженные недостатки, такие как отсутствие воспроизводимости, технические проблемы выполнения, а также сложности в сравнении фингерпринтов [67], ограничивают его применимость. Кроме того, метод показал очень низкую дискриминирующую способность. При тестировании 103 штаммов *Y. pestis* из различных очагов чумы Китая удалось выявить только два RAPD-профиля. Причем большинство штаммов из провинции Цинхай относились к одному типу, а большинство штаммов из других районов Китая принадлежало к другому [68].

ПЦР с праймерами на повторяющиеся элементы генома. REP-ПЦР – это метод генотипирования, основанный на амплификации различных последовательностей повторяющихся элементов ДНК, таких как экстрагенные повторяющиеся палиндромы, энтеробактериальный повторяющийся межгенный консенсус–ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) и BOX-элементы. Полученные в ПЦР фрагменты разной длины анализируют методом электрофореза. ERIC-ПЦР и ERIC-BOX-ПЦР применяли для расследования вспышки инфекции в Индии, связанной со штаммами *Y. pestis*. При помощи этих методов были идентифицированы все три биовара, и установлена связь заболевания человека с резервуаром инфекции. При использовании ERIC-BOX-ПЦР не удалось отличить штаммы *bv. medievalis* от *bv. antiqua*. Профили ERIC-ПЦР были сопоставимы с MLVA-типами [69]. Несмотря на успех в этом небольшом исследовании, метод REP-ПЦР не может быть рекомендован в качестве единственного метода генотипирования чумного микроба, особенно если необходимо проанализировать большое количество штаммов, поскольку для других видов микроорганизмов была выявлена низкая воспроизводимость результатов типирования [70].

Мультилокусный VNTR-анализ. VNTR – относительно короткие тандемные повторы ДНК, количество копий которых может отличаться у разных штаммов. Изменение числа повторов приводит к изменению размера амплифицируемого фрагмента ДНК. Количество повторов определяют в ПЦР с помощью пары праймеров, фланкирующих целевые VNTR. Тандемные повторы большого размера определяют с помо-

щью стандартного электрофореза, а повторы меньшего размера, могут быть детектированы при помощи электрофореза в полиакриламидном геле или путем капиллярного электрофореза, так как требуют более высокой разрешающей способности метода детекции. Анализ нескольких локусов VNTR также известен как MLVA [71]. Первым VNTR, который был использован для типирования штаммов чумного микроба, был повтор CAAA. При исследовании 35 штаммов *Y. pestis* авторы обнаружили 9 аллелей данного повтора [72]. В последующем при анализе доступных полногеномных сиквенсов *Y. pestis* идентифицировали гораздо больше VNTR с разным размером повторяющихся единиц [73–75].

Несколько исследований провели с использованием двух разработанных оригинальных MLVA-систем. Одна из них (MLVA43) первоначально основывалась на анализе 42 локусов VNTR [73], но позднее была модифицирована путем удаления трех локусов и добавления четырех других [76]. Другая схема (MLVA25) содержала праймеры для амплификации 25 локусов VNTR, семь из которых авторы рекомендовали для быстрого сравнения вновь выявленных штаммов с генотипами, включенными в созданную базу данных [74, 77]. Семь локусов VNTR для двух схем анализа были общими [75, 77].

Схему MLVA25 создали, основываясь на анализе трех штаммов *Y. pestis* [74], и затем использовали для изучения внутривидового разнообразия 180 штаммов чумного микроба, 61 генотип которых для дальнейшего сравнения был внесен в сформированную базу данных [77]. При исследовании в MLVA25 более 500 штаммов *Y. pestis*, выделенных большей частью на территории Китая удалось выявить 350 генотипов [78], а изучение 100 штаммов *Y. pestis* из 37 регионов Монголии выявило 65 генотипов, 54 из которых были описаны впервые [79]. MLVA25 адаптировали для полевых условий с использованием биоанализатора Agilent 2100 [80, 81], а 14 из 25 MLVA локусов используют в методе анализа кривых плавления высокого разрешения (HRMA – High-Resolution Melting Analysis) [82].

MLVA43 использовали для более разнообразных видов исследований. Первоначально показали, что данный метод способен разделить не только набор из 12 глобально распространенных штаммов *Y. pestis*, но и 12 штаммов из округа Сискию, Калифорния [73]. Данный метод продемонстрировал высокую дискриминационную способность при исследовании штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* (102 генотипа среди 104 тестированных изолятов) [3], анализе штаммов *Y. pestis*, выделенных от павших луговых собачек в Аризоне [76], а также при проведении мониторинга за очагами чумы на территории Мадагаскара [83]. В двух работах доказали пространственные закономерности распределения MLVA43-типов [76, 83], подтверждая пригодность метода для проведения филогеографических исследований. Однако при проведении аналогичного исследования на 48 штаммах *Y. pestis* из Казахстана большинство изолятов попало в неразделенную политомию и мало соотносилось с известными очагами чумы [84]. MLVA43 также успешно использовали для изучения краткосрочной микроэволюции чумного микроба в вымершей колонии луговых собачек и для анализа десятилетней серии вспышек инфекции в Махаджнге на Мадагаскаре [85], выявляя различные пространственные и

временные закономерности соответственно. Метод полезен для изучения штаммов из одной географической области, а также штаммов, выделенных на протяжении какого-то временного периода, так как в этом варианте анализа используют большее число VNTR с очень высокими темпами мутаций по сравнению с системой MLVA25. Экспериментально подтверждено, что скорость мутаций отдельных локусов VNTR достигает $3,7 \times 10^{-4}$ мутаций/генераций, а общая скорость мутаций метода MLVA43 достигает $1,1 \times 10^{-3}$ мутаций/генераций [76, 86].

Lowell et al. [87] использовали 17 из 43 локусов MLVA для анализа 13 наборов штаммов чумного микроба, собранных при эпидемиологическом мониторинге за природными очагами инфекции на юго-западе США. Авторам удалось связать штаммы, выделенные от людей, с предполагаемыми источниками инфекции, что еще раз продемонстрировало полезность метода MLVA для проведения эпидрасследований. Особый интерес представлял анализ штамма чумного микроба, выделенного в 2002 г. от человека в Нью-Йорке, не эндемичном для данной инфекции. Авторы установили, что заражение пациента произошло в Нью-Мексико, исключив тем самым случай биотерроризма. Kingston et al. [69] использовали вариации MLVA7 и MLVA25 для анализа небольшого набора штаммов *Y. pestis* из Индии, связанных со вспышкой чумы, и не нашли совпадений с генотипами, находящимися в глобальной базе данных, демонстрируя высокую дискриминационную способность даже небольшого числа локусов VNTR. X.Zhang et al. [88] отобрали 14 наиболее повторяющихся/больших VNTR-локусов из схем MLVA25 и MLVA43 и использовали их для анализа 213 штаммов *Y. pestis* из различных очагов чумы в Китае. Авторы идентифицировали 84 генотипа, которые соответствовали биофармам и очагам выделения чумного микроба. С использованием 11 локусов VNTR из MLVA25, а также одного VNTR локуса из работы Adair et al. [72], Oliveira et al. [89] исследовали 20 штаммов *Y. pestis* с эпизоотической вспышки в Sítio Alagoinha (Бразилия) в 1967 г. и 17 штаммов со вспышки там же в 1986 г. В отличие от предыдущих неудачных попыток генотипирования, в которых штаммы не обладали различиями, анализ на основе VNTR обеспечил 100% разделение 37 штаммов *Y. pestis* и также идентифицировал три генетические группы, которые коррелировали с географическим/временным происхождением штаммов [89].

Недавно разработали третью схему MLVA-типирования (MLVA14+12), включающую анализ 14+12 VNTR, результаты которой были сопоставимы с SNP-типированием. Эти VNTR обеспечивали 100% разделение 97 штаммов *Y. pestis*, представлявших 21 субпопуляцию SNP. Из использованных 14 и 12 VNTR 9 и 8 соответственно были взяты из схем MLVA43 и/или MLVA25, тогда как оставшиеся 5 и 4 были описаны впервые. Набор из 956 штаммов *Y. pestis*, проанализированный с помощью иерархической системы MLVA14+12, позволил получить паттерны кластеризации, в основном согласующиеся с SNP-анализом, и предоставил базу данных для будущих сравнений. Авторы отметили, что эта система обеспечивала дискриминацию при одновременном сокращении времени и затрат и минимизации возможного искажения гомоплазии, вызванного быстро мутирующими локусами VNTR [75].

Таким образом, MLVA обладает наибольшей дискриминационной способностью среди всех методов генотипирования *Y. pestis*, основанных на анализе фрагментов ДНК, разделяя штаммы на основе их биоварной принадлежности и/или популяционной структуры [3, 69, 73–75, 77, 78, 84, 88], географического происхождения [75, 76, 78, 83, 88, 89] и даже времени выделения [85]. Метод отличается высокой воспроизводимостью и возможностью обмена данными между лабораториями. MLVA успешно использовали для дифференциации глобально распространенных штаммов [3, 73, 77, 78], изолятов, выделенных в одном регионе [73, 76, 78, 79, 83, 84, 88, 89], и даже при изучении локальных вспышек инфекции [73, 85]. Хотя MLVA успешно разделяет группы штаммов *Y. pestis* в соответствии с различными критериями, филогенетические связи между ними могут быть искажены из-за мутационного насыщения, которое может быстро происходить в развивающихся локусах VNTR [3, 90, 83]. Определенные успехи в решении данных ограничений получили при использовании иерархического подхода в методе MLVA14+12 [75]. Однако общая дискриминационная способность данной системы, вероятно, ниже, чем у MLVA43, поскольку в ней отсутствуют некоторые из самых разнообразных локусов [75, 86]. Данные, полученные при выполнении MLVA штаммов *Y. pestis*, в основном согласуются с результатами других методов генотипирования, например, с позиционным IS-типированием, DFR-анализом, CRISPR-анализом и SNP-типированием [72, 78, 79, 83, 85].

Методы генотипирования, основанные на секвенировании

Анализ 16S и 23S рPHK. Гены 16Sp PHK *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* идентичны на 100%. Сообщалось о существовании только одного сайта SNP в гене 23S рPHK у двух данных видов [91]. Таким образом, данный метод не подходит для идентификации иерсиний на уровне вида и их генотипирования.

Мультилокусное секвенирование. MLST (Multilocus Sequencing Typing) – один из методов молекулярного типирования, позволяющий оценить варибельность нуклеотидных последовательностей нескольких генов одновременно [5]. Схемы анализа направлены на 6 различных генов, которые распределены по геному так, чтобы избежать связи между ними. Схему MLST-анализа, включающую фрагменты генов 16Sp PHK, *glnA*, *gyrB*, *recA* и *hsp60*, использовали для типирования 58 штаммов, принадлежащих ко всем известным видам внутри рода *Yersinia*. Данный метод смог отделить штаммы *Y. pestis* от *Y. pseudotuberculosis*, но оказался непригодным для субтипирования штаммов чумного микроба из-за низкого количества обнаруженных полиморфизмов [92]. Схему MLST, включающая анализ полиморфизма 5 генов «домашнего хозяйства» (*thrA*, *trpE*, *glnA*, *tmk*, *dmsA*) и одного гена, отвечающего за биосинтез липополисахарида (*manB*), использованная для типирования 36 штаммов *Y. pestis*, 12 штаммов *Y. pseudotuberculosis* и 13 штаммов *Y. enterocolitica*, не выявила различий среди штаммов чумного микроба, но обнаружила идентичные или почти идентичные последовательности для штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, что позволило предположить, что чумной микроб образовался путем дивергенции от *Y. pseudotuberculosis*

примерно 1500 и 20 000 лет назад [49]. Аналогичную схему MLST применили для изучения генетического полиморфизма девяти штаммов группы *Y. pestis* subsp. *microti*, показав при этом, что данные штаммы более близки *Y. pestis* subsp. *pestis*, чем *Y. pseudotuberculosis* [3]. MLST 46 штаммов *Y. pestis* из Республики Грузии и стран СНГ с использованием большего числа локусов (гены 16S рPHK, *hsp60*, *glnA*, *gyrB*, *recA*, *manB*, *thrA* и *tmk*, а также *caf1*, *lcrV*, *psaA* и *pla*) выявил два сиквенс-типа, отличавшихся одним полиморфизмом в двух генах и отделявших «грузинские» штаммы от «негрузинских» [21]. Другую схему MLST, нацеленную на фрагменты генов «домашнего хозяйства» (*adk*, *argA*, *aroA*, *glnA*, *thrA*, *tmk* и *trpE*), использовали для анализа 1015 штаммов патогенных иерсиний, в том числе и 52 штаммов *Y. pestis* из природных очагов чумы Китая и других стран. Схема типирования позволила успешно отличить *Y. pestis* от *Y. pseudotuberculosis*, используя лишь один полиморфизм в локусе гена *trpE*, но обнаружила очень мало вариаций внутри штаммов возбудителя чумы. В данном исследовании было выявлено четыре сиквенс-типа среди штаммов чумного микроба, три из которых были уникальны для отдельных штаммов [93]. Секвенирование других фрагментов генома возбудителя чумы (ген *lcrV* и локус *pgm*) также не позволило идентифицировать генетический полиморфизм, пригодный для типирования штаммов [72, 94]. В целом при помощи MLST подтвердилась идея о том, что *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, скорее всего, являются двумя линиями одного вида [49, 92]. Данный метод не подходит для внутривидовой дифференциации штаммов чумного микроба из-за его низкой разрешающей способности.

Разработанная на основе MLST методика для быстрой индикации и идентификации трех возбудителей особо опасных инфекций (*Bacillus anthracis*, *Y. pestis* и *Francisella tularensis*) продемонстрировала потенциальную возможность дифференциации штаммов чумного микроба. Данный метод состоит из двух отдельных анализов, основанных на микрофлюидике, которые нацелены на десять локусов для каждого из трех потенциальных агентов биотерроризма. Первый анализ состоит из мультиплексной ПЦП, которая позволяет идентифицировать каждого из возбудителей, основываясь на его уникальном электрофоретическом профиле. Второй анализ связан с нетрадиционным анализом, подобным MLST, который направлен на секвенирование определенных локусов в геноме и обеспечивает дополнительную дискриминацию штаммов. Благодаря целевым локусам, которые включают как хромосомные, так и плазмидные мишени, методика при тестировании панели из 34 штаммов *Y. pestis* позволяла успешно дифференцировать отдельные биовары [95].

CRISPR-анализ. Элементы CRISPR состоят из коротких палиндромных повторов размером 21–37 п.н., разделенных спейсерами сопоставимого размера [96]. Типирование штаммов на основе CRISPR возможно благодаря высокой степени полиморфизма спейсеров. У *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* существует три локуса CRISPR: YPa, YPb и YPc (также называемые YP1, YP2 и YP3 соответственно), причем локус YPa является наиболее варибельным [10, 97]. С. Pourcel et al. [10] впервые описали изменчивость локусов CRISPR для штаммов *Y. pestis*, идентифицировав 21, 9 и

3 аллеля, которые были результатом различных комбинаций 26, 14, и 5 различных спейсеров для YPa, YPb и YPc. G.Vergnaud et al. [98] идентифицировали дополнительные уникальные спейсеры в локусе YPa штаммов *Y. pestis*, после чего их общее количество достигло 71. Cui et al. [97] проанализировали все три локуса CRISPR в шести доступных полногеномных последовательностях чумного микроба, а также у 125 штаммов *Y. pestis* из 26 природных очагов чумы Китая, Монголии и стран СНГ. В данном исследовании идентифицировали 35, 16 и 7 аллелей 83, 37 и 11 спейсеров в локусах YPa, YPb и YPc соответственно и обнаружили 49 CRISPR-типов для 131 штамма *Y. pestis*. Распределение CRISPR-типов, а также отдельных спейсеров среди штаммов коррелировало с природными очагами чумы, что указывает на возможность использования данного метода для филогенетического анализа. В дальнейшем при анализе 100 штаммов *Y. pestis* из 37 районов Монголии обнаружили в общей сложности 14 CRISPR-типов, шесть из которых были описаны впервые [79]. Недавно выполненный анализ полиморфизма локусов CRISPR у 128 штаммов *Y. pestis* из Бразилии выявил 16 и 5 новых спейсеров в локусах YPa и YPb соответственно [99].

Данный метод может быть использован для проведения филогенетических исследований. CRISPR-анализ близкородственных штаммов *Y. pestis* позволил определить правила эволюции локусов CRISPR [10], а исследование разнообразной коллекции изолятов чумного микроба – предположить, какой CRISPR-тип имел предок современных штаммов *Y. pestis* [98]. В ходе исследования большого числа штаммов из Китая и стран СНГ был предложен эволюционный сценарий *Y. pestis*, а также пути распространения штаммов [94]. Анализ 128 генетически гомогенных изолятов чумного микроба из 5 очагов чумы в Бразилии выявил ограниченное число уникальных CRISPR-типов, причем большинство штаммов принадлежало к одному CRISPR-типу [99].

В целом было показано, что данные CRISPR-анализа при проведении типирования чумного микроба согласуются с результатами кластеризации штаммов на основе SNP, DFR и MLVA [9, 79, 97, 99]. Таким образом, CRISPR-типирование может быть эффективным методом внутривидовой дифференциации, когда не требуется высокий уровень дискриминации, хотя необходимо учитывать стоимость секвенирования фрагментов ДНК.

Полногеномное секвенирование. Данные по полногеномному секвенированию *Y. pestis* растут быстрыми темпами. Первый полногеномный сиквенс был сделан для штамма *Y. pestis* CO92 из Северной Америки [41]. Это дало новый толчок исследованиям по выявлению потенциальных полиморфных локусов, которые можно было бы использовать в различных схемах субтипирования штаммов чумного микроба [51, 73, 77]. Затем выполнили полногеномное секвенирование штаммов *Y. pestis* KIM10+ (популяция 2.MED, биовар *medievalis*) [40], *Antiqua* (популяция 1.ANT, биовар *antiqua*), Nepal516 (популяция 2.ANT, биовар *antiqua*) [39] и 91001 (популяция 0.PE4 биовар *microti*) [42]. После чего было опубликовано еще несколько полногеномных сиквенсов для штаммов чумного микроба из различных природных очагов инфекции в странах СНГ и Китае, включающих штаммы Pestoides F [63], B42003004, K1973002, E1979001, F1991016

[62], D106004, D182038 [64, 68], Z176003 [64] и 2501 [100]. Полногеномные сиквенсы получили для штаммов из Африки: Angola [12] и UG05-0454 (популяция 1.ANT, биовар *antiqua*) [5] и штамма S3 из Индии (биовар *antiqua*) [101]. Дополнительно провели полногеномное секвенирование штаммов 1.ORI (биовар *orientalis*), в том числе из Северной Америки: FV-1 [102], CA88-4125 [61], 90A-4021, 92A-4261, 97A-7970 [103] и EBD10-058 [104]; La Paz из Боливии [103]; INS из Перу [105]; 9, 113 и 24H из Индии [101]; MG05-1020 и IP275 из Мадагаскара; и IP674 из Турции [5]. Черновое полногеномное секвенирование также было проведено для штаммов из стран СНГ и Монголии 0.PE2 (биовар *caucasica*) C-537, C-590, C-290, C-197, C-235, C-267, C-359, C-291, C-346, C-666 [106], C-746, C-824, C-739, C-712, C-370, C-535, C-678, C-700 [107]; 0.PE4B (биовар *altaica*) I-3455, A-513 [106], I-3442, I-3443, I-3446, I-3447, I-3515, I-3516, I-3517, I-3518, I-3519 [108]; 0.PE4B (биовар *talassica*) A-1804, A-1807 [106]; 0.PE4B (биовар *hissarica*) 5307-Gis; 0.PE4C (биовар *xilingolensis*) I-3134; 0.PE5 (биовар *ulegeica*) I-3189, I-2422, I-2239 [106], I-2231, I-2238, I-3190, I-2236, I-2457 [109]. Все вышеперечисленные полногеномные сиквенсы предоставили достаточно данных для сравнения геномов и исследования микроэволюции и распространения штаммов *Y. pestis*.

Кроме этого, полногеномное секвенирование проводили для решения более конкретных задач. Так, секвенирование полного генома штамма *Y. pestis* KIMD27 подчеркнуло важность устранения ошибок секвенирования при сравнении геномов, особенно между близкородственными штаммами [110]. Полногеномный сиквенс нескольких вариантов штамма *Y. pestis* EV76 (EV76-CH) из Китая выявил полиморфизмы, которые могут использоваться при изучении истории распространения линий данного вакцинного штамма [111]. Проведение черного полногеномного секвенирования штаммов *Y. pestis* от жертв «Черной смерти» в 1348–1350 гг. в Лондоне позволило понять происхождение второй пандемии инфекции [112]. Кроме того, черновое полногеномное секвенирование штаммов *Y. pestis* от жертв Юстиниановой чумы помогло выявить источник первой пандемии [113]. Cui et al. [4] секвенировали геномы 118 штаммов чумного микроба из Китая, стран СНГ и Монголии для изучения филогении вида *Y. pestis* и поиска общего предшественника. Gibbons et al. [114] секвенировали девять штаммов *Y. pestis*, выделенных во время сезонной вспышки чумы 2009 г. в Нью-Мексико. Vogler et al. [85] секвенировали четыре штамма чумного микроба, изолированных во время вспышек чумы на Мадагаскаре в 1990-х гг.

В целом за последние годы полногеномное секвенирование превратилось из единичных исследований, полезных для обнаружения полиморфных локусов для последующего изучения большего количества штаммов с помощью других молекулярно-генетических методов, в самостоятельный метод генотипирования.

Полногеномное секвенирование штамма *Y. pseudotuberculosis* IP32953 подтвердило тесную генетическую связь между возбудителями псевдотуберкулеза и чумы, выявив, что с момента отделения от *Y. pseudotuberculosis* чумной микроб приобрел 32 хромосомных гена [115]. Существование небольших генетических отличий между двумя видами создает проблему для разработки надежных видоспецифиче-

ских методов идентификации *Y. pestis*. Различия внутри геномов штаммов *Y. pestis* встречаются достаточно редко и могут представлять собой SNP, вставки, делеции, различия в расположении IS-элементов и внутригеномные перестройки [4, 5, 12, 39, 40–42, 61–65, 85, 102–105, 110–114, 116]. Геномные перестройки, связанные с вставками инсерционных последовательностей, являются наиболее часто встречающимися для штаммов *Y. pestis*, что было отмечено в ряде полногеномных исследований [12, 39, 40–42, 61–65]. На поиске различий в расположении IS-элементов основываются ряд методов типирования чумного микроба, таких как PFGE, IS-RFLP, позиционное IS-типирование [7, 14]. Полиморфизм единичных нуклеотидов, обнаруженный при помощи сравнения полногеномных последовательностей, оказал большое влияние на типирование *Y. pestis*, что позволило детально реконструировать филогению чумного микроба [4, 5, 72]. Хотя SNP очень полезны, но относительно редки из-за происхождения и низкой частоты встречаемости. Несмотря на относительно низкую частоту встречаемости SNP происхождения чумного микроба встречаются редко, они могут служить высокоинформативными маркерами при проведении генотипирования штаммов возбудителя чумы и изучения их филогенетических взаимоотношений, почти не проявляя гомоплазии [4, 5, 72].

SNP-анализ. Увеличение количества данных, полученных при полногеномном секвенировании штаммов, привело к росту выявления SNP, проведению филогенетического анализа и определению микроэволюции и путей распространения *Y. pestis*. M.Achtman et al. [3] впервые провели анализ 3250 ортологичных кодирующих последовательностей трех доступных на тот момент геномов *Y. pestis* (штаммы CO92, KIM10+ и 91001) и выявили среди них 76 синонимичных SNP (sSNP). Скрининг 105 различных штаммов чумного микроба на основе денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) выявил 4 дополнительных sSNP и позволил построить первое филогенетическое дерево для *Y. pestis*, содержащее три основных ветви (0, 1 и 2), восемь основных популяций (0.PE1, 0.PE2, 0.PE3, 0.PE4, 1.ANT, 1.ORI, 2.ANT и 2.MED), а также провести оценку возраста для точек ветвления. Это филогенетическое деление соответствовало классической номенклатуре биоваров, что привело M.Achtman et al. [3] к предложению новой номенклатуры вида, основанной на названиях ветвей дендрограммы, содержащих ссылки на соответствующие им биовары (т.е. PE для биовара *microti* (PEstoides), ANT для биовара *ANTiqua*, MED для биовара *MEDievalis* и ORI для биовара *ORientalis*). Это исследование определило, что биовар *antiqua* состоит как минимум из двух отдельных популяций 1.ANT и 2.ANT из Африки и Азии соответственно, что дискредитировало гипотезу Devignat [15], связывающую три классических биовара с тремя пандемиями чумы [3].

Позднее при анализе 17 полногеномных сиквенсов обнаружили 933 SNP, которые использовали для изучения генетического многообразия 286 штаммов *Y. pestis*, выделенных в различных местах мира. При построении расширенного филогенетического дерева идентифицировали еще несколько популяций, позволяющих сделать многочисленные выводы о микроэволюции и распространении штаммов чумного микроба. В частности, предположили, что образование

Y. pestis произошло, скорее всего, на территории Китая или вблизи от него, а затем в результате многочисленных эпидемий и пандемий возбудитель распространился по миру. Временная оценка при использовании филогении в сочетании с историческими записями позволяет предположить, что чума пришла в Западную Азию по Великому Шелковому Пути, а в Африку – морским путем из Китая [5].

Совсем недавно было проведено еще одно обширное исследование с использованием 2326 SNP, обнаруженных при анализе 133 полногеномных сиквенсов чумного микроба. Результаты работы еще более уточнили филогению *Y. pestis*, выявив при этом дополнительные ветви, а также несколько политомий, включающих одну во время пандемии чумы, названной «Черной смертью», и вторую в основании группы 1.ORI, отвечающей за третью пандемию. Анализ молекулярных часов в этом исследовании показал значительное изменение скорости фиксации SNP в течение филогении, возможно, из-за чередования эндемического и эпидемического периодов. Что касается микроэволюции и распространения штаммов *Y. pestis*, данное исследование подтвердило происхождение чумы в Китае, а также предположительно сузило этот ареал до Тибетского нагорья. Кроме того, авторы высказали предположение, что штамм Angola может быть родственен штамму, ответственному за Юстинианову чуму [4], а гипотезу, связывающую распространение штаммов ветви 1.ANT морскими путями из Китая, опровергли [4, 5].

SNP-анализ также может быть использован при исследовании различных по размеру выборок штаммов, отличающихся по географическим ареалам и продолжительности времени выделения. Morelli et al. [5] представили анализ экспансии штаммов *Y. pestis* в США и на Мадагаскаре, основанный на SNP. В независимом исследовании 262 штаммов *Y. pestis* из 25 районов Мадагаскара за период 1939–2005 гг. провели анализ набора из 56 SNP и 43 локусов VNTR (MLVA43). SNP-анализ выявил существование несколько групп штаммов и был использован в качестве средства валидации результатов MLVA43, который продемонстрировал более высокую дискриминационную способность [83]. Riehm et al. [79] использовали MLVA25 для подразделения 100 монгольских штаммов чумного микроба на 65 MLVA25-типов, образующих шесть кластеров. Авторы провели выборочное SNP-типирование для некоторых штаммов, чтобы связать обнаруженные при помощи MLVA25 кластеры с ранее идентифицированными группами на основе SNP-анализа.

Хотя обнаружение SNP для *Y. pestis* напрямую зависит от доступности данных полногеномного секвенирования, скрининг SNP проводят несколькими способами. Могут быть использованы ПЦП-амплификация и секвенирование [79], мультиплексный анализ Lumiplex [111]. Денатурирующая ВЭЖХ применялась как метод генотипирования известных SNP и обнаружения дополнительных SNP в двух крупных глобальных исследованиях [3, 5]. Масс-спектрометрия MALDI-TOF (MS) была использована в качестве метода скрининга для панелей SNP разного размера как для большого (900), так и для небольшого (19) количества [5, 102]. Анализ мутационной амплификации по несоответствию расплава (Melt-MAMA) очень универсален и использовался для скрининга большой коллекции штаммов *Y. pestis* из Мада-

гаскара по 77 SNP с дополнительным скринингом SNP с использованием анализа TaqMan-минорной бороздки (MGB) [83, 85]. ПЦР-анализ TaqMan в реальном времени особенно хорошо подходит в случаях, когда требуется высокая чувствительность. Vogler et al. [117] разработали два анализа TaqMan-MGB, нацеленных на SNP, специфичные для североамериканского штамма *Y. pestis* CO92 соответственно, и проверили их на панели из 116 разнообразных штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. Кроме того, McAvin et al. [118] разработали специфичный для *Y. pestis* анализ Taqman для развертываемого в полевых условиях термоциклера RAPID, хотя о целевом SNP не сообщалось, как и об идентичности протестированных штаммов *Y. pestis* филогенетическим группам.

Заключение

Успешность подхода для внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis* зависит от нескольких факторов, а именно метода, выбранного для типирования, а также конкретных задач, которые должны быть решены в процессе типирования. Ключевыми факторами по отношению к *Y. pestis* является общее низкое внутривидовое разнообразие, относительно недавнее происхождение (данный микроорганизм является эволюционно «молодым»), клональность и различные типы вариаций, присутствующие в геноме возбудителя чумы (наличие различных геномных перестроек, IS-элементов, VNTRs и SNPs). Несколько методов типирования успешно применяли для идентификации вида *Y. pestis* и его двух подвидов. Меньшее число методов являются применимыми для дальнейшей дифференциации штаммов чумного микроба до отдельных биоваров или даже до конкретной очаговой географической приуроченности. Успех типирования зависит от выбранной мишени, частоты мутаций и подверженности конвергентной эволюции. Таким образом, при использовании VNTR-локусов возможно различить даже очень близкородственные штаммы чумного микроба, что делает этот метод особенно успешным при проведении эпидемиологических исследований. В свою очередь, SNP-типирование позволяет точно определять филогенетические связи между штаммами, тем самым предоставляя информацию о появлении и распространении *Y. pestis*. В настоящее время кажется очевидным, что полногеномное секвенирование является предпочтительным методом генетической характеристики штаммов чумного микроба. Однако этот молекулярно-генетический подход до сих пор остается дорогостоящим и не подходит для рутинных лабораторных исследований. В связи с этим поиск SNP является предпочтительным методом типирования при проведении филогенетических исследований, а для обеспечения дополнительной дискриминационной силы лучше использовать MLVA.

Финансирование

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора.

Литература/References

- Perry RD, Fetherston JD. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. Clin Microbiol Rev. 1997 Jan;10(1):35-66.
- Galimand M, Guiyoule A, Gerbaud G, Rasoamanana B, Chanteau S, Carniel E? et al. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. N Engl J Med. 1997 Sep 4;337(10):677-80. DOI: 10.1056/NEJM199709043371004
- Achtman M, Morelli G, Zhu P, Wirth T, Diehl I, Kusecek B, et al. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Dec 21;101(51):17837-42. Epub 2004 Dec 14. DOI: 10.1073/pnas.0408026101.
- Cui Y, Yu C, Yan Y, Li D, Li Y, Jombart T, et al. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jan 8;110(2):577-82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110
- Morelli G, Song Y, Mazzoni CJ, Eppinger M, Roumagnac P, Wagner DM, et al. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. Nat Genet. 2010 Dec;42(12):1140-3. DOI: 10.1038/ng.705
- Keim PS, Wagner DM. Humans and evolutionary and ecological forces shaped the phylogeography of recently emerged diseases. Nat Rev Microbiol. 2009 Nov; 7(11):813-21. DOI: 10.1038/nrmicro2219
- Platonov ME, Evseeva VV, Dentovskaya SV, Anisimov AP (2013) Molecular typing of *Yersinia pestis*. Mol Gen Mikrobiol Virusol. 2013 Apr;2:3–12.
- Dai E, Tong Z, Wang X, Li M, Cui B, Dai R, et al. Identification of different regions among strains of *Yersinia pestis* by suppression subtractive hybridization. Res Microbiol. 2005 Aug;156(7):785-9. DOI: 10.1016/j.resmic.2005.02.012
- Li Y, Dai E, Cui Y, Li M, Zhang Y, Wu M, et al. Different region analysis for genotyping *Yersinia pestis* isolates from China. PLoS One. 2008 May 14;3(5): e2166. DOI: 10.1371/journal.pone.0002166
- Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. Microbiology. 2005 Mar;151(Pt 3):653-63. DOI: 10.1099/mic.0.27437-0
- Schork NJ, Fallin D, Lanchbury JS. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. Clin Genet. 2000 Oct;58(4):250-64.
- Eppinger M, Worsham PL, Nikolich MP, Riley DR, Sebastian Y, Mou S, et al. Genome sequence of the deep-rooted *Yersinia pestis* strain Angola reveals new insights into the evolution and pangenome of the plague bacterium. J Bacteriol. 2010 Mar;192(6):1685-99. DOI: 10.1128/JB.01518-09
- Anisimov AP1, Lindler LE, Pier GB. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. Clin Microbiol Rev. 2004 Apr;17(2):434-64. DOI: 10.1128/cmr.17.2.434-464.2004
- Lindler LE. Typing methods for the plague pathogen, *Yersinia pestis*. J AOAC Int. 2009 Jul-Aug;92(4):1174-83.
- Devignat R. Varietes de l'espece *Pasteurella pestis*: nouvelle hypothese. Bull World Health Organ. 1951;4(2):247-63.
- Одиноков ГН, Ерошенко ГА, Кутырев ВВ. Сравнительный анализ структуры гена *invY* штаммов чумного и псевдотуберкулезного микробов. Проблемы особо опасных инфекций. 2009;2(100):50-52. / Odinokov GN, Eroshenko GA, Kutyrev VV Comparative Analysis of *invY* Gene Structure in Strains of Plague and Pseudotuberculosis Agents. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2009;2(100):50-52. (In Russian).
- Zhou D, Han Y, Song Y, Huang P, Yang R. Comparative and evolutionary genomics of *Yersinia pestis*. Microbes Infect. 2004 Nov;6(13):1226-34. DOI: 10.1016/j.micinf.2004.08.002.
- Zhou D, Tong Z, Song Y, Han Y, Pei D, Pang X, et al. Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and the proposal of a new biovar, microtus. J Bacteriol. 2004 Aug;186(15):5147-52. DOI: 10.1128/JB.186.15.5147-5152.2004
- Zhou D, Han Y, Song Y, Tong Z, Wang J, Guo Z, et al. DNA microarray analysis of genome dynamics in *Yersinia pestis*: insights into bacterial genome microevolution and niche adaptation. J Bacteriol. 2004 Aug;186(15):5138-46. DOI: 10.1128/JB.186.15.5138-5146.2004
- Kiefer D, Dalantai G, Damdindorj T, Riehm JM, Tomaso H, Zöller L, et al. Phenotypical characterization of Mongolian *Yersinia pestis* strains. Vector Borne Zoonotic Dis. 2012 Mar;12(3):183-8. DOI: 10.1089/vbz.2011.0748

21. Revazishvili T, Rajana C, Bakanidze L, Tsertsvadze N, Imnadze P, O'Connell K, et al. Characterisation of *Yersinia pestis* isolates from natural foci of plague in the Republic of Georgia, and their relationship to *Y. pestis* isolates from other countries. *Clin Microbiol Infect.* 2008 May;14(5):429-36. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2008.01953.x
22. Cabanel N, Leclercq A, Chenal-Francisque V, Annajar B, Rajerison M, Bekkhoucha S. Plague outbreak in Libya, 2009, unrelated to plague in Algeria. *Emerg Infect Dis.* 2013 Feb;19(2):230-6. DOI: 10.3201/eid1902.121031
23. Cavalcanti YV, Leal NC, De Almeida AM. Typing of *Yersinia pestis* isolates from the state of Ceara, Brazil. *Lett Appl Microbiol.* 2002;35(6):543-7.
24. Leal NC, de Almeida AM, Ferreira LC. Plasmid composition and virulence-associated factors of *Yersinia pestis* isolates from a plague outbreak at the Paraiba State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1989 Sep-Oct;31(5):295-300. DOI: 10.1590/s0036-46651989000500001.
25. Eppinger M, Radnedge L, Andersen G, Vietri N, Severson G, Mou S, et al. Novel plasmids and resistance phenotypes in *Yersinia pestis*: unique plasmid inventory of strain Java 9 mediates high levels of arsenic resistance. *PLoS One.* 2012; 7(3):e32911. DOI: 10.1371/journal.pone.0032911
26. Chu MC, Dong XQ, Zhou X, Garon CF. A cryptic 19-kilobase plasmid associated with US isolates of *Yersinia pestis*: a dimer of the 9.5-kilobase plasmid. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Nov;59(5):679-86. DOI: 10.4269/ajtmh.1998.59.679
27. Dong X, Ye F, Peng H. Geographic distribution and feature of *Yersinia pestis* plasmid isolated from Yunnan province. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2001 Oct;22(5):344-7.
28. Guiyoule A, Grimont F, Iteman I, Grimont PA, Lefèvre M, Carniel E. Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis* strains. *J Clin Microbiol.* 1994 Mar;32(3):634-41.
29. Eroshenko GA, Pavlova AI, Kukleva LM, Shavina Nlu, Kutyrev VV. Genotyping of *Yersinia pestis* strains on the basis of variation of ribosomal rRNA biosynthesis genes. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2007 May-Jun;(3):6-10.
30. Hai R, Yu DZ, Wei JC, Xia LX, Shi XM, Zhang ZK, Zhang EM. Molecular biological characteristics and genetic significance of *Yersinia pestis* in China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2004 Jun;25(6):509-13.
31. Wei JC, Yu DZ, Hai R. The geographical distribution of ribotypes of *Yersinia pestis* in China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2003 Nov;24(11):1027-30.
32. Lucier TS, Brubaker RR. Determination of genome size, macrorestriction pattern polymorphism, and nonpigmentation-specific deletion in *Yersinia pestis* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Bacteriol.* 1992 Apr;174(7):2078-86. DOI: 10.1128/jb.174.7.2078-2086.1992
33. Rakin A, Heesemann J. The established *Yersinia pestis* biovars are characterized by typical patterns of I-CeuI restriction fragment length polymorphism. *Mol Gen Microbiol Virusol.* 1995 Jul-Sep;(3):26-9.
34. Barros MP, Silveira-Filho VM, Lins RH, Oliveira MB, Almeida AM, Leal-Balbino TC. Subtyping Brazilian *Yersinia pestis* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Genet Mol Res.* 2013 Apr 17;12(2):1294-302. DOI: 10.4238/2013
35. Guiyoule A, Rasoamanana B, Buchrieser C, Michel P, Chanteau S, Carniel E. Recent emergence of new variants of *Yersinia pestis* in Madagascar. *J Clin Microbiol.* 1997 Nov;35(11):2826-33.
36. Huang XZ, Chu MC, Engelthaler DM, Lindler LE. Genotyping of a homogeneous group of *Yersinia pestis* strains isolated in the United States. *J Clin Microbiol.* 2002 Apr;40(4):1164-73. DOI: 10.1128/jcm.40.4.1164-1173.2002
37. Shi L, Ye R, Dong S, Guo Y, Yang G, Zhang R, et al. Genotyping and its epidemiological significance on Yunnan *Yersinia pestis* under Fse I enzyme digestion method. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2014 Feb;35(2):182-5.
38. Zhang Z, Hai R, Song Z, Xia L, Liang Y, Cai H, et al. Spatial variation of *Yersinia pestis* from Yunnan Province of China. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Oct;81(4):714-7. DOI: 10.4269/ajtmh.2009.09-0174.
39. Chain PS, Hu P, Malfatti SA, Radnedge L, Larimer F, Vergez LM, et al. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strains Antiqua and Nepal516: evidence of gene reduction in an emerging pathogen. *J Bacteriol.* 2006 Jun;188(12):4453-63. DOI: 10.1128/JB.00124-06
40. Deng W, Burland V, Plunkett G 3rd, Boutin A, Mayhew GF, Liss P, et al. Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. *J Bacteriol.* 2002 Aug;184(16):4601-11. DOI: 10.1128/jb.184.16.4601-4611.2002
41. Parkhill J, Wren BW, Thomson NR, Titball RW, Holden MT, Prentice MB. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature.* 2001 Oct 4; 413(6855):523-7. DOI: 10.1038/35097083
42. Song Y, Tong Z, Wang J, Wang L, Guo Z, Han Y, et al. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans. *DNA Res.* 2004 Jun 30;11(3):179-97. DOI: 10.1093/dnares/11.3.179
43. Portnoy DA, Falkow S. Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*. *J Bacteriol.* 1981 Dec;148(3):877-83.
44. Filippov AA, Solodovnikov NS, Kookleva LM, Protsenko OA. Plasmid content in *Yersinia pestis* strains of different origin. *FEMS Microbiol Lett.* 1990 Jan 15;55(1-2):45-8. DOI: 10.1016/0378-1097(90)90165-m
45. Filippov AA, Oleinikov PV, Motin VL, Protsenko OA, Smirnov GB. Sequencing of two *Yersinia pestis* IS elements, IS285 and IS100. *Contrib Microbiol Immunol.* 1995;13:306-9.
46. Filippov AA, Oleinikov PN, Bobrov AG, Motin VL, Konnov NP, Smirnov GB. Comparative study of the structure and distribution of two IS elements in *Yersinia pestis*. *Genetika.* 1994;30:166.
47. Simonet M, Riot B, Fortineau N, Berche P. Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the *inv* gene. *Infect Immun.* 1996 Jan;64(1):375-9.
48. Odaert M, Devalckenaere A, Trieu-Cuot P, Simonet M. Molecular Characterization of IS1541 Insertions in the Genome of *Yersinia pestis*. *J Bacteriol.* 1998 Jan; 180(1):178-81.
49. Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A, Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Nov 23;96(24):14043-8. DOI: 10.1073/pnas.96.24.14043
50. Torrea G, Chenal-Francisque V, Leclercq A, Carniel E. Efficient tracing of global isolates of *Yersinia pestis* by restriction fragment length polymorphism analysis using three insertion sequences as probes. *J Clin Microbiol.* 2006 Jun;44(6):2084-92. DOI: 10.1128/JCM.02618-05
51. Motin VL, Georgescu AM, Elliott JM, Hu P, Worsham PL, Ott LL, et al. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*glpD*). *J Bacteriol.* 2002 Feb;184(4):1019-27. DOI: 10.1128/jb.184.4.1019-1027.2002
52. Radnedge L, Gamez-Chin S, McCready PM, Worsham PL, Andersen GL. Identification of nucleotide sequences for the specific and rapid detection of *Yersinia pestis*. *J Appl Environ Microbiol.* 2001 Aug;67(8):3759-62. DOI: 10.1128/AEM.67.8.3759-3762.2001
53. Radnedge L, Agron PG, Worsham PL, Andersen GL. Genome plasticity in *Yersinia pestis*. *Microbiology.* 2002 Jun;148(Pt 6):1687-98. DOI: 10.1099/00221287-148-6-1687
54. Hinchliffe SJ, Isherwood KE, Stabler RA, Prentice MB, Rakin A, Nichols RA. Application of DNA microarrays to study the evolutionary genomics of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Genome Res.* 2003 Sep;13(9):2018-29. DOI: 10.1101/gr.1507303
55. Yang X, Wei B, Jin J, Li C, Xiong H, Xin Y, et al. Regional genotyping and the geographical distribution regarding *Yersinia pestis* isolates in China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2014 Aug;35(8):943-8.
56. Dai RX, Wei BQ, Li CX, Xiong HM, Yang XY, Fan W, et al. The pathogenic ecology research on plague in Qinghai plateau. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 2013 Dec;47(12):1083-8.
57. Li C, Wei B, Xiong H, Qi M, Yang X, Xin Y, et al. Sources of infection on human plague in Qinghai province. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2014 Feb; 35(2):178-81.

58. Li M, Dai EH, Dai RX, Zhou DS, Yang XY, Cui BZ, et al. Study on the genotyping and microevolution of *Yersinia pestis* in the Qinghai-Tibet Plateau. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2006 May;27(5):412-5.
59. Qi ZZ, Dai EH, Zhou DS, Yang YH, Yu SH, Dai RX, et al. A molecular epidemiological study on human plague fulminant epidemic in Qinghai, 2004. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2006 Apr;27(4):316-8.
60. Wang XH, Zhang H, Guo LM, Miao KJ, DA WP, Wu B. Analysis on genotype distributions and epidemiological characteristics of *Yersinia pestis* plague foci in Gansu province. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2013 May;34(5):433-7.
61. Auerbach RK, Tuanyok A, Probert WS, Kenefic L, Vogler AJ, Bruce DC, et al. *Yersinia pestis* evolution on a small timescale: comparison of whole genome sequences from North America. *PLoS One*. 2007 Aug 22;2(8):e770. DOI: 10.1371/journal.pone.0000770
62. Eppinger M, Guo Z, Sebastian Y, Song Y, Lindler LE, Yang R, et al. Draft genome sequences of *Yersinia pestis* isolates from natural foci of endemic plague in China. *J Bacteriol*. 2009 Dec;191(24):7628-9. DOI: 10.1128/JB.01227-09
63. Garcia E, Worsham P, Bearden S, Malfatti S, Lang D, Larimer F, et al. Pestoides F, an atypical *Yersinia pestis* strain from the former Soviet Union. *Adv Exp Med Biol*. 2007;603:17-22. DOI: 10.1007/978-0-387-72124-8_2
64. Shen X, Wang Q, Xia L, Zhu X, Zhang Z, Liang Y, et al. Complete genome sequences of *Yersinia pestis* from natural foci in China. *J Bacteriol*. 2010 Jul;192(13):3551-2. DOI: 10.1128/JB.00340-10
65. Liang Y, Hou X, Wang Y, Cui Z, Zhang Z, Zhu X. Genome rearrangements of completely sequenced strains of *Yersinia pestis*. *J Clin Microbiol*. 2010 May; 48(5):1619-23. DOI: 10.1128/JCM.01473-09
66. Liang Y, Xie F, Tang X, Wang M, Zhang E, Zhang Z, et al. Chromosomal rearrangement features of *Yersinia pestis* strains from natural plague foci in China. *Am J Trop Med Hyg*. 2014 Oct;91(4):722-8. DOI: 10.4269/ajtmh.13-0491
67. Power EG. RAPD typing in microbiology – a technical review. *J Hosp Infect*. 1996 Dec;34(4):247-65.
68. Huang F, Yu D, Hai R, Cai H. Study on the application of random amplified polymorphic DNA in *Yersinia pestis* genotyping. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2000 Dec;21(6):424-6.
69. Kingston JJ, Tuteja U, Kapil M, Murali HS, Batra HV. Genotyping of Indian *Yersinia pestis* strains by MLVA and repetitive DNA sequence based PCRs. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2009 Oct;96(3):303-12. DOI: 10.1007/s10482-009-9347-2
70. Meacham KJ, Zhang L, Foxman B, Bauer RJ, Marrs CF. Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. *J Clin Microbiol*. 2003 Nov;41(11):5224-6.
71. Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol*. 2000 May;182(10):2928-36. DOI: 10.1128/jb.182.10.2928-2936.2000
72. Adair DM, Worsham PL, Hill KK, Klevytska AM, Jackson PJ, Friedlander AM, et al. Diversity in a Variable-Number Tandem Repeat from *Yersinia pestis*. *J Clin Microbiol*. 2000 Apr;38(4):1516-9.
73. Klevytska AM1, Price LB, Schupp JM, Worsham PL, Wong J, Keim P. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J Clin Microbiol*. 2001 Sep;39(9):3179-85. DOI: 10.1128/jcm.39.9.3179-3185.2001
74. Le Flèche P, Hauck Y, Onteniente L, Prieur A, Denoëud F, Ramisse V, et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol*. 2001;1:2.
75. Li Y, Cui Y, Cui B, Yan Y, Yang X, Wang H, et al. Features of variable number of tandem repeats in *Yersinia pestis* and the development of a hierarchical genotyping scheme. *PLoS One*. 2013 Jun 21;8(6):e66567. DOI: 10.1371/journal.pone.0066567
76. Girard JM, Wagner DM, Vogler AJ, Keys C, Allender CJ, Drickamer LC, et al. Differential plague-transmission dynamics determine *Yersinia pestis* population genetic structure on local, regional, and global scales. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 1;101(22):8408-13. Epub 2004 May 20. DOI: 10.1073/pnas.0401561101
77. Pourcel C, André-Mazeaud F, Neubauer H, Ramisse F, Vergnaud G. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol*. 2004 Jun 8;4:22. DOI: 10.1186/1471-2180-4-22
78. Li Y, Cui Y, Hauck Y, Platonov ME, Dai E, Song Y. Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. *PLoS One*. 2009 Jun 22;4(6):e6000. DOI: 10.1371/journal.pone.0006000
79. Riehm JM1, Vergnaud G, Kiefer D, Damdindorj T, Dashdavaa O, Khurelsukh T, et al. *Yersinia pestis* lineages in Mongolia. *PLoS One*. 2012;7(2):e30624. DOI: 10.1371/journal.pone.0030624. Epub 2012 Feb 17. DOI: 10.1371/journal.pone.0030624
80. Ciammaruoni A. Microchip Capillary electrophoresis of multi-locus VNTR analysis for genotyping of *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis* in microbial forensic cases. *Methods Mol Biol*. 2012;830:381-90. DOI: 10.1007/978-1-61779-461-2_26. DOI: 10.1007/978-1-61779-461-2_26
81. Ciammaruoni A, Grassi S, De Santis R, Faggioni G, Pittiglio V, D'Amelio R, et al. Fieldable genotyping of *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis* based on 25-loci Multi Locus VNTR Analysis. *BMC Microbiol*. 2008 Jan 29;8:21. DOI: 10.1186/1471-2180-8-21
82. Ciammaruoni A, Grassi S, Faggioni G, De Santis R, Pittiglio V, D'Amelio R, et al. A rapid allele variant discrimination method for *Yersinia pestis* strains based on high-resolution melting curve analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009 Sep; 65(1):7-13. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.04.015
83. Vogler AJ, Chan F, Wagner DM, Roumagnac P, Lee J, Nera R, et al. Phylogeography and molecular epidemiology of *Yersinia pestis* in Madagascar. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Sep;5(9):e1319. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001319
84. Lowell JL, Zhansarina A, Yockey B, Meka-Mechenko T, Stybayeva G, Atshabar B, et al. Phenotypic and molecular characterizations of *Yersinia pestis* isolates from Kazakhstan and adjacent regions. *Microbiology*. 2007 Jan;153(1):169-77. DOI: 10.1099/mic.0.29059-0
85. Vogler AJ, Chan F, Nottingham R, Andersen G, Drees K, Beckstrom-Sternberg SM, et al. A decade of plague in Mahajanga, Madagascar: insights into the global maritime spread of pandemic plague. *MBio*. 2013 Feb 12;4(1):e00623-12. DOI: 10.1128/mBio.00623-12
86. Vogler AJ, Keys CE, Allender C, Bailey I, Girard J, Pearson T, et al. Mutations, mutation rates, and evolution at the hypervariable VNTR loci of *Yersinia pestis*. *Mutat Res*. 2007 Mar 1;616(1-2):145-58. Epub 2006 Dec 11. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2006.11.007
87. Lowell JL, Wagner DM, Atshabar B, Antolin MF, Vogler AJ, Keim P, et al. Identifying sources of human exposure to plague. *J Clin Microbiol*. 2005 Feb;43(2):650-6. DOI: 10.1128/JCM.43.2.650-656.2005
88. Zhang X, Hai R, Wei J, Cui Z, Zhang E, Song Z, et al. MLVA distribution characteristics of *Yersinia pestis* in China and the correlation analysis. *BMC Microbiol*. 2009 Sep 23;9:205. DOI: 10.1186/1471-2180-9-205
89. Oliveira MB, Barros MP, Silveira-Filho VM, Araújo-Nepomuceno MR, Balbino VQ, Leal NC, et al. Genetic diversity of *Yersinia pestis* in Brazil. *Genet Mol Res*. 2012 Sep 25;11(3):3414-24. DOI: 10.4238/2012.September.25.10
90. Keim P, Van Ert MN, Pearson T, Vogler AJ, Huynh LY, Wagner DM. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infect Genet Evol*. 2004 Sep;4(3):205-13. DOI: 10.1016/j.meegid.2004.02.005
91. Trebesius K, Harmsen D, Rakin A, Schmelz J, Heesemann J. Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. *J Clin Microbiol*. 1998 Sep;36(9):2557-64.
92. Kotetishvili M, Kreger A, Wauters G, Morris JG Jr, Sulakvelidze A, Stine OC. Multilocus sequence typing for studying genetic relationships among *Yersinia* species. *J Clin Microbiol*. 2005 Jun;43(6):2674-84. DOI: 10.1128/JCM.43.6.2674-2684.2005

93. Duan R, Liang J, Shi G, Cui Z, Hai R, Wang P, et al. Homology analysis of pathogenic *Yersinia species*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, and *Yersinia pestis* based on multilocus sequence typing. J Clin Microbiol. 2014 Jan;52(1):20-9. DOI: 10.1128/JCM.02185-13
94. Buchrieser C, Rusniok C, Frangeul L, Couve E, Billault A, Kunst F. The 102-kilobase *pgm* locus of *Yersinia pestis*: sequence analysis and comparison of selected regions among different *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains. Infect Immun. 1999 Sep;67(9):4851-61.
95. Turingan RS, Thomann HU, Zolotova A, Tan E, Selden RF. Rapid focused sequencing: a multiplexed assay for simultaneous detection and strain typing of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, and *Yersinia pestis*. PLoS One. 2013;8(2):e56093. DOI: 10.1371/journal.pone.0056093. Epub 2013 Feb 13.
96. Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Mol Microbiol. 2002 Mar;43(6):1565-75.
97. Cui Y, Li Y, Gorgé O, Platonov ME, Yan Y, Guo Z, et al. Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats. PLoS One. 2008 Jul 9;3(7):e2652. DOI: 10.1371/journal.pone.0002652
98. Vergnaud G, Li Y, Gorgé O, Cui Y, Song Y, Zhou D, et al. Analysis of the three *Yersinia pestis* CRISPR loci provides new tools for phylogenetic studies and possibly for the investigation of ancient DNA. Adv Exp Med Biol. 2007;603:327-38. DOI: 10.1007/978-0-387-72124-8_30
99. Barros MP, França CT, Lins RH, Santos MD, Silva EJ, Oliveira MB et al. Dynamics of CRISPR loci in microevolutionary process of *Yersinia pestis* strains. PLoS One. 2014 Sep 29;9(9):e108353. DOI: 10.1371/journal.pone.0108353. eCollection 2014
100. Sun S, Yang X, Yuan Y, Dai X, Yan Y, Cao H, et al. Draft genome sequence of *Yersinia pestis* strain 2501, an isolate from the great gerbil plague focus in Xinjiang, China. J Bacteriol. 2012 Oct;194(19):5447-8. DOI: 10.1128/JB.01150-12
101. Mahale KN, Paranjape PS, Marathe NP, Dhotre DP, Chowdhury S, Shetty SA, et al. Draft genome sequences of *Yersinia pestis* strains from the 1994 plague epidemic of Surat and 2002 Shimla outbreak in India. Indian J Microbiol. 2014 Dec;54(4):480-2. DOI: 10.1007/s12088-014-0475-7
102. Touchman JW, Wagner DM, Hao J, Mastrian SD, Shah MK, Vogler AJ, et al. A North American *Yersinia pestis* draft genome sequence: SNPs and phylogenetic analysis. PLoS One. 2007 Feb 21;2(2):e220. DOI: 10.1371/journal.pone.0000220
103. Cummings CA, Bormann Chung CA, Fang R, Barker M, Brzoska P. Accurate, rapid and high-throughput detection of strain-specific polymorphisms in *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis* by next-generation sequencing. Investig Genet. 2010 Sep 1;1(1):5. DOI: 10.1186/2041-2223-1-5
104. Antonation KS, Shury TK, Bollinger TK, Olson A, Mabon P, Van Domselaar G, et al. Sylvatic plague in a Canadian black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*). J Wildl Dis. 2014 Jul;50(3):699-702. DOI: 10.7589/2013-08-215
105. Cáceres O, Montenegro J, Padilla C, Tarazona D, Bailón H, García P, et al. Whole-genome sequencing and comparative analysis of *Yersinia pestis*, the causative agent of a plague outbreak in northern Peru. Genome Announc. 2013 Jan;1(1):pii: e00249-12. DOI: 10.1128/genomeA.00249-12. Epub 2013 Feb 28.
106. Kislichkina AA, Bogun AG, Kadnikova LA, Maiskaya NV, Platonov ME, Anisimov NV, et al. Nineteen Whole-Genome Assemblies of *Yersinia pestis* subsp. *microtus*, Including Representatives of Biovars *caucasica*, *talassica*, *hissarica*, *altaica*, *xilingolensis*, and *ulegeica*. Genome Announc. 2015 Nov-Dec; 3(6): e01342-15. DOI: 10.1128/genomeA.01342-15
107. Kislichkina AA, Bogun AG, Kadnikova LA, Maiskaya NV, Solomentsev VI, Platonov ME, et al. Eight Whole-Genome Assemblies of *Yersinia pestis* subsp. *microtus* bv. *caucasica* Isolated from the Common Vole (*Microtus arvalis*) Plague Focus in Dagestan, Russia. Genome Announc. 2017 Aug; 5(34): e00847-17. DOI: 10.1128/genomeA.00847-17
108. Kislichkina AA, Bogun AG, Kadnikova LA, Maiskaya NV, Solomentsev VI, Dentovskaya SV, et al. Nine Whole-Genome Assemblies of *Yersinia pestis* subsp. *microtus* bv. *altaica* Strains Isolated from the Altai Mountain Natural Plague Focus (No. 36) in Russia. Genome Announc. 2018 Jan; 6(3): e01440-17. DOI: 10.1128/genomeA.01440-17
109. Kislichkina AA, Bogun AG, Kadnikova LA, Maiskaya NV, Solomentsev VI, Sizova AA, et al. Six Whole-Genome Assemblies of *Yersinia pestis* subsp. *microtus* bv. *ulegeica* (Phylogroup O.PE5) Strains Isolated from Mongolian Natural Plague Foci. Genome Announc. 2018 Jun; 6(25): e00536-18. DOI: 10.1128/genomeA.00536-18
110. Losada L, Varga JJ, Hostetler J, Radune D, Kim M, Durkin S, et al. Genome sequencing and analysis of *Yersinia pestis* KIM D27, an avirulent strain exempt from select agent regulation. PLoS One. 2011 Apr 29;6(4):e19054. DOI: 10.1371/journal.pone.0019054
111. Cui Y, Yang X, Xiao X, Anisimov AP, Li D, Yan Y, et al. Genetic variations of live attenuated plague vaccine strains (*Yersinia pestis* EV76 lineage) during laboratory passages in different countries. Infect Genet Evol. 2014 Aug;26:172-9. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.05.023.
112. Bos KI, Schuenemann VJ, Golding GB, Burbano HA, Waglegner N, Coombes BK, et al. A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. Nature. 2011 Oct 12;478(7370):506-10. DOI: 10.1038/nature10549
113. Wagner DM, Klunk J, Harbeck M, Devault A, Waglegner N, Sahl JW, et al. *Yersinia pestis* and the Plague of Justinian 541–543 AD: a genomic analysis. Lancet Infect Dis. 2014 Apr;14(4):319-26. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70323-2
114. Gibbons HS, Krepps MD, Ouellette G, Karavis M, Onischuk L, Leonard P, et al. Comparative genomics of 2009 seasonal plague (*Yersinia pestis*) in New Mexico. PLoS One. 2012;7(2):e31604. DOI: 10.1371/journal.pone.0031604
115. Chain PS, Carniel E, Larimer FW, Lamerdin J, Stoutland PO, Regala WM, et al. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Sep 21; 101(38):13826-31. Epub 2004 Sep 9. DOI: 10.1073/pnas.0404012101
116. Yan Y, Wang H, Li D, Yang X, Wang Z, Qi Z, et al. Two-step source tracing strategy of *Yersinia pestis* and its historical epidemiology in a specific region. PLoS One. 2014 Jan 9;9(1):e85374. DOI: 10.1371/journal.pone
117. Vogler AJ, Keim P, Wagner DM. A review of methods for subtyping *Yersinia pestis*: from phenotypes to whole genome sequencing. Infect Genet Evol. 2016 Jan;37:21-36. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.10.024
118. McAvin JC, McConathy MA, Rohrer AJ, Huff WB, Barnes WJ, Lohman KL. A real-time fluorescence polymerase chain reaction assay for the identification of *Yersinia pestis* using a field-deployable thermocycler. Mil Med. 2003 Oct;168(10):852-5.

Информация об авторах:

Вагайская Анастасия Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0102
E-mail: vagaiskaya.anastasiya@gmail.com

Трунякова Александра Сергеевна, стажер-исследователь лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0102
E-mail: Sasha_trunyakova@mail.ru

Information about authors:

Anastasiya S. Vagaiskaya, junior researcher of laboratory for plague microbiology State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0112
E-mail: vagaiskaya.anastasiya@gmail.com

Alexandra S. Trunyakova, junior researcher of laboratory for plague microbiology State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0112
E-mail: Sasha_trunyakova@mail.ru

Развитие инструментальных методов исследования бактерий в ГНЦ ПМБ

И.Г.Говорунов

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

В работе ретроспективно представлены исследования бактерий нефелометрическими, флуориметрическими, ионометрическими и микроскопическими методами. Показаны основные результаты исследований влияния низкотемпературного замораживания-оттаивания, лиофилизации и детергентов различных классов на оболочечный комплекс грамотрицательных бактерий. На примере отдельных представителей грамотрицательных бактерий освещены перспективы и ограничения данных методов в области исследования их структурно-функциональной организации.

Для цитирования: Говорунов И.Г. Развитие инструментальных методов исследования бактерий в ГНЦ ПМБ. Бактериология. 2019; 4(2): 55–60. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-55-60

Development of instrumental methods of studying bacteria in SCRAMB

I.G.Govorunov

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

A retrospective study of bacteria by nephelometric, fluorimetric, ionometric, and microscopic methods are presented. The main results of studies of the effect of low-temperature freezing-thawing, lyophilization and detergents of various classes on the shell complex of gram-negative bacteria are shown. On the example of individual representatives of gram-negative bacteria, the perspectives and limitations of these methods in the field of the study of their structural and functional organization are highlighted.

For citation: Govorunov I.G. Development of instrumental methods of studying bacteria in SCRAMB. Bacteriology. 2019; 4(2): 55–60. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-55-60

Небольшая группа выпускников биофака Днепропетровского университета прибыла по распределению во Всесоюзный научно-исследовательский институт прикладной микробиологии (ВНИИ ПМ) в начале августа 1976 г. В этот год таких прибывших было сотни полторы. Весь институт помещался в одноэтажном здании барачного типа на окраине подмосковного поселка Протвино. Градообразующим предприятием поселка с 25-тысячным населением (а ныне наукограда) был Институт физики высоких энергий.

Трудоустройством научных сотрудников занимался Константин Иванович Волковой, возглавлявший тогда отдел генетики. Значительную часть сотрудников направляли на стажировку или в аспирантуру в крупные научно-исследовательские центры медико-биологического профиля в Москву, Ленинград, Саратов, Волгоград, Пущино-на-Оке и др. Остальные должны были осваивать строящийся институт.

Первые корпуса вспомогательного лабораторного городка (ВЛГ) мы увидели лишь в октябре. До этого несколько бригад будущих ученых и специалистов трудились на сельхозработках в совхозе «Большевик» Серпуховского района.

Меня направили в лабораторию №5 под руководством к.б.н. В.В.Перельгина (в настоящее время ведущий научный сотрудник отдела биологических технологий), в группу с.н.с.



Говорунов Игорь Геннадиевич кандидат биологических наук, старший научный сотрудник. Работает во ФБУН ГНЦ ПМБ с 1976 года, в настоящее время в должности ведущего научного сотрудника. Возглавляет отдел информационных технологий. Ответственный секретарь журнала «Бактериология». Автор более 70 научных работ, включая одно изобретение и 4 базы данных. Специализируется в области мониторинга инфекционных заболеваний и визуализации геопространственной информации.

Е.О.Пучкова (ныне доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Всероссийской коллекции микроорганизмов, ИБФМ РАН). В разное время в группе работали Н.В.Косарев, С.А.Иванов, Т.Ю.Кудрявцева, до сих пор работающие в институте, Н.В.Петухова, В.А.Пинчукова, Н.В.Трофименко, М.М.Спирин. Группа занималась изучением обо-



К.И.Волковой,
доктор медицинских наук,
профессор, полковник военно-
медицинской службы в отставке,
в последней должности –
главный научный сотрудник.
До этого длительное время
возглавлял отдел генетики.
Фото 2000 г.

лочечного комплекса бактерий и исследованием влияния на него различных повреждающих агентов: детергентов, высушивания, замораживания-оттаивания. Традиционным объектом исследований была *E. coli*. Использовался широкий спектр методов исследования: флуориметрия и фотометрия, ионометрия, различные модификации световой микроскопии. Многие работы выполнялись в содружестве с сотрудниками лаборатории №6 под руководством В.Я.Волкова (ЯМР-спектроскопия), вычислительного центра и др. Мне поручили заниматься изучением криовоздействий на микробную клетку.

Криобиология тогда была на пике своего развития. В Харькове был создан Институт проблем криобиологии и криомедицины, издавался журнал «Криобиология», в Институте биофизики (Пушино-на-Оке) Б.Н.Вепринцев развернул работы по сохранению генофонда редких животных путем криоконсервации. Он же организовал ряд семинаров по криобиологии и издание брошюр серии «Консервация генетических ресурсов».

Что же касается тематики лаборатории №5, то с теоретической точки зрения считалось, что наиболее перспективным методом хранения бактерий является низкотемпературное замораживание, поскольку при температурах кипения сжиженных газов скорости химических реакций практически равны нулю. Существенным недостатком криоконсервации была инаktivация части бактериальной популяции под действием повреждающих факторов замораживания-оттаивания. В связи с этим необходимо было разработать эффективные режимы хранения бактерий и способы их защиты от криоповреждений на основе исследования механизмов возникновения этих повреждений.

Известно, что при замораживании бактерий повреждаются главным образом их мембраны, поэтому передо мной поставили задачи разработки методов выявления повреждений барьерных свойств мембран после замораживания-оттаивания, исследования повреждений мембран с помощью этих методов и выявления влияния этих повреждений на жизнеспособность микробной клетки при различных холодовых воздействиях.

Для регистрации целостности барьерных свойств цитоплазматической мембраны было решено использовать реакцию плазмолиза – осмотическую реакцию клеток при помещении в гипертоническую среду, сопровождающуюся сжатием протопласта и отслоением цитоплазматической мембраны от клеточной стенки. В университете на кафедре



Обсуждение результатов эксперимента. Слева направо: м.н.с. И.Г.Говорунов, с.н.с. Е.О.Пучков, ст. лаб. В.А.Пинчукова (1978 г.)

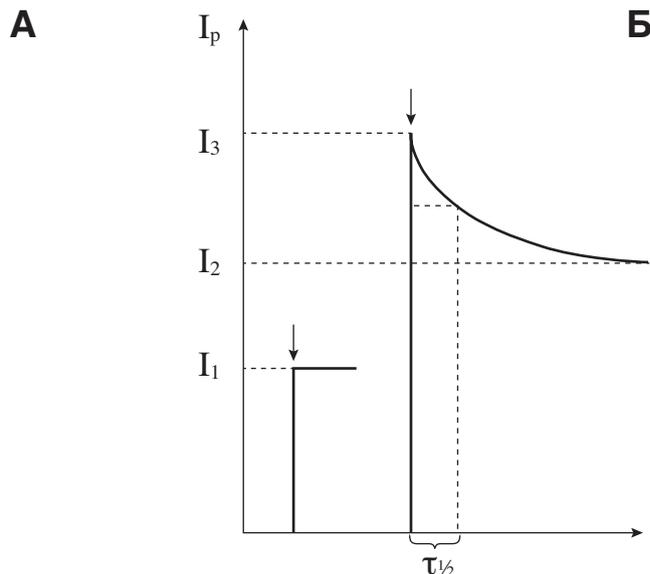
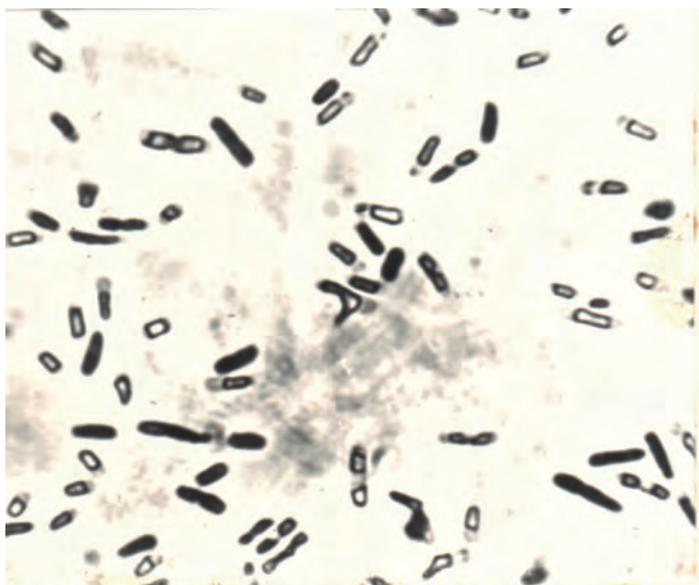
физиологии растений я впервые увидел плазмолиз на препарате кожицы лука. Возможно, самое первое наблюдение этой реакции у бактерий описал доктор А.Иванов в 1901 г. [К вопросу о плазмолизе бактерий [Из Бактериол. ин-та Моск. ун-та]; [Соч.] Д-ра мед. Александра Иванова. – Санкт-Петербург: К.Л. Риккер, 1901. – 15 с.; 24].

Реакция плазмолиза сопровождается изменением оптических свойств клеточной суспензии – возрастает светорассеяние. Вслед за этим может наступить деплазмолиз – набухание протопласта, сопровождающееся уменьшением оптической плотности (светорассеяния) суспензии клеток. Параметры этой реакции и, в частности, их практическое использование на тот момент были слабо изучены.

Поскольку лаборатория №5 только организовалась, то оборудования в ней еще не было. Многие установки и приборы мы делали или модифицировали самостоятельно. Под руководством Е.О.Пучкова я смонтировал установку на базе флуориметра ЭФ-3М, дополнив его стабилизатором напряжения ртутной лампы и самописцем КСП-4. Сильный разогрев от ртутной лампы компенсировали термостатированием измерительной ячейки. Прибор позволял регистрировать как светорассеяние, так и флуоресценцию. Позднее работы были продолжены на флуориметре Perkin-Elmer 1000.

В результате проведенных исследований были определены оптимальные условия регистрации оптических изменений суспензии бактериальных клеток при плазмолизе, а также была установлена зависимость этой реакции от физиологического состояния клеток (фаза роста, среда культивирования). Для количественной оценки регистрации реакции плазмолиза бактерий по светорассеянию были предложены параметры: интенсивность плазмолиза, степень и скорость деплазмолиза. А по изменению первого параметра в средах с различной осмолярностью можно было определять внутриклеточное осмотическое давление.

Опыты по селективному (грамицидин D) и неселективно (толуол) повреждению барьерных свойств мембран бактерий показали, что по мере разрушения мембран интенсивность плазмолиза падала, причем светорассеяние суспен-



Плазмолиз бактерий *E. coli*. А – микрофотография, фазовый контраст. Б – светорассеяние суспензии клеток *E. coli* при плазмолизе (слева – водная суспензия, справа – суспензия в концентрированном растворе KCl).

зии в воде не изменялось. Поскольку цитоплазматическая мембрана, в отличие от наружной мембраны грамотрицательных бактерий, представляет барьер проницаемости для низкомолекулярных веществ (неорганические соли, сахара), то отсутствие реакции плазмолиза и соответствующего уменьшения светорассеяния суспензии в гипертоническом растворе может быть показателем нарушения ее барьерных свойств. На этом был построен метод регистрации нарушения барьерных свойств цитоплазматической мембраны.

В основу регистрации повреждений внешней мембраны, непроницаемой для ряда красителей, мы положили взаимодействие клеток с бромистым этидием. Этот краситель при связывании с нуклеиновыми кислотами сильно флуоресцирует, что обусловлено интеркаляцией молекул красителя между азотистыми основаниями нуклеиновых кислот и возрастанием квантового выхода флуоресценции. Было обнаружено, что с интактными клетками *E. coli* краситель не взаимодействует. В то же время в присутствии ЭДТА и детергентов краситель диффундирует через цитоплазматическую мембрану бактерий, связывается внутриклеточной ДНК, что сопровождается увеличением флуоресценции. Поскольку ЭДТА избирательно повреждал только внешнюю

мембрану, то мы использовали этот феномен для оценки повреждения именно внешней мембраны.

В дальнейших исследованиях мы оценивали повреждение внешней и цитоплазматической мембраны *E. coli* при низкотемпературном замораживании и других экстремальных воздействиях.

В целях выделения отдельных повреждающих факторов мы разбили процесс замораживания-оттаивания на отдельные этапы, прохождение которых контролировали при помощи откалиброванной термопары, помещаемой в замораживаемый образец. Использование этого методического приема позволило выявить различия в чувствительности внешней и цитоплазматической мембран бактерий к холодовым воздействиям.

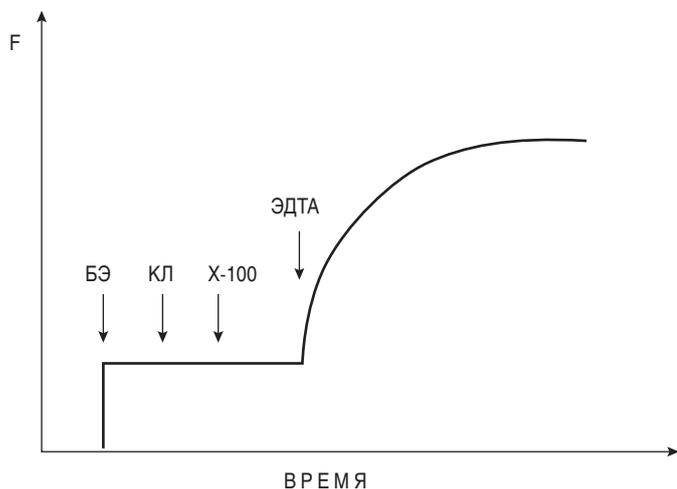
1) Холодовой шок вызывал временные повреждения цитоплазматической мембраны, зарегистрированные по выходу внутриклеточного K^+ , которые восстанавливались при отогреве. Дыхательная активность клеток, способность к плазмолизу и жизнеспособность оставались без изменений. При этом барьерные свойства внешней мембраны для бромистого этидия не изменялись – внешняя мембрана не повреждалась.

2) Внеклеточная кристаллизация льда приводила к повреждению внешней мембраны. Поскольку по мере кристаллизации льда в водном растворе происходит концентрирование присутствующих солей, то мы предположили, что это и есть причина повреждения целостности внешней мембраны. Это подтверждалось опытами с кратковременным выдерживанием бактерий в растворе NaCl. Конкурентное взаимодействие одновалентных катионов (K^+ , Na^+) с ионами Mg^{+2} , стабилизирующими липополисахарид внешней мембраны, было аналогично действию ЭДТА на клетки.

3) Низкотемпературное замораживание, при котором происходит и внутриклеточная кристаллизация воды, приводило к устойчивому повреждению и цитоплазматической мембраны, о чем свидетельствует снижение интенсивности плазмолиза.



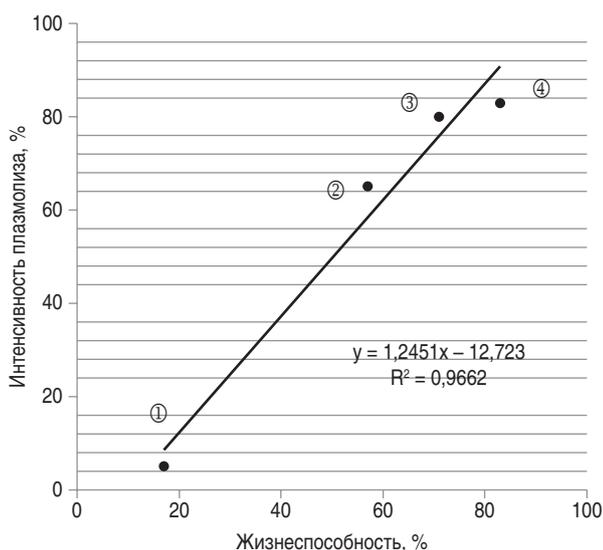
Флуориметр ЭФ-3М.



Влияние ЭДТА и тритона X-100 на проницаемость оболочки *E. coli* для бромистого этидия. Стрелками показаны моменты внесения в кювету красителя (БЭ), клеток (КЛ), детергента (X-100) и ЭДТА.

Известно, что стойкое нарушение барьерных свойств цитоплазматической мембраны бактерий, в отличие от таковых внешней мембраны, существенным образом влияет на жизнеспособность бактериальной клетки. В связи с этим мы изучили корреляцию между изменениями плазмолитической реакции и жизнеспособностью бактерий, определяемой после высева на чашки Петри с питательной средой (КОЕ). Варьируя условия замораживания (присутствие/отсутствие криопротекторов, добавки NaCl), мы получали образцы с различным уровнем инактивации бактерий. При этом оказалось, что жизнеспособность популяции коррелирует с интенсивностью плазмолиза, определяемой по светорассеянию. На этом был построен экспресс-метод оценки жизнеспособности бактерий.

По результатам этих исследований под руководством д.б.н. Ю.В.Евтодиенко (Институт биофизики АН, Пущино-на-Оке) и Е.О.Пучкова я подготовил и защитил кандидатскую диссертацию.



Корреляционный анализ жизнеспособности и интенсивности плазмолиза суспензий *E. coli* после замораживания-оттаивания в различных средах: 1 – NaCl; 2 – H₂O; 3 – ДМСО (7%); 4 – глицерин (1%).

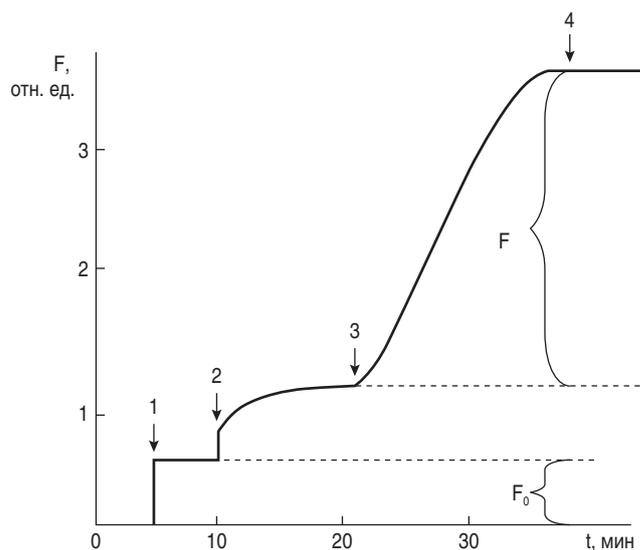
цию. Кроме руководителей, в оформлении и собственно защите мне, как и многим другим соискателям и аспирантам, оказал неоценимую помощь тогдашний ученый секретарь института Юрий Михайлович Помыткин. За время его работы в центре было защищено более 50 докторских и 200 кандидатских диссертаций. Закончили аспирантуру более 120 сотрудников. Практически все защиты прошли без замечаний.

В технологии приготовления и хранения лиофильно высушенных бактериальных препаратов существует проблема контроля качества, в частности, содержания (концентрации) жизнеспособных клеток. Это актуально также при поддержании музейных коллекций.

Использовать реакцию плазмолиза для оценки жизнеспособности лиофильно высушенных бактерий было нецелесообразно, поскольку после этой процедуры в суспензии присутствовали наряду с жизнеспособными клетками мертвые клетки, остатки клеточной стенки и пр., что существенно искажало данные светорассеяния. Использование фазово-контрастной микроскопии было невозможно по тем же причинам. Основываясь на ранее полученных данных о возможности определения общей концентрации бактериальных клеток в суспензии, а также жизнеспособности популяции после замораживания-оттаивания по флуоресценции бромистого этидия, мы исследовали взаимодействие красителя с лиофильно высушенными препаратами бактерий после их регидратации с целью разработки экспресс-метода определения концентрации жизнеспособных клеток в этих препаратах.

Было установлено, что взаимодействие красителя с лиофилизированными-регидратированными культурами бактерий позволяет выявить по крайней мере три субпопуляции клеток:

- а) клетки, у которых отсутствует барьер проницаемости для бромистого этидия;
- б) клетки с поврежденной внешней мембраной (предположительно);
- в) неповрежденные клетки (предположительно).



Взаимодействие лиофилизированных/регидратированных клеток *Y. pestis* с бромистым этидием. Стрелками показаны моменты внесения в измерительную кювету: 1 – раствора бромистого этидия; 2 – исследуемой суспензии клеток; 3 – раствора цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ).

Гетерогенность популяции лиофилизированных-регидратированных культур подтверждалась данными фазово-контрастной (морфологическая гетерогенность) и флуоресцентной (по разной светимости клеток, окрашенных бромистым этидием) микроскопии, а также цитометрическими измерениями (флуоресценция и светорассеяние отдельных клеток).

Корреляционный анализ флуоресценции неповрежденной части популяции с данными высева на плотную питательную среду (КОЕ) позволил выявить линейную связь ($R^2 > 0,88$) между ними в отношении 17 произвольно отобранных лиофильно высушенных препаратов авирулентных культур *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis*.

Данный подход было предложено использовать в качестве экспресс-метода оценки концентрации жизнеспособных клеток в лиофилизированных/регидратированных препаратах сухих живых вакцин и пробиотических препаратов грамотрицательных бактерий на этапах оптимизации процесса лиофилизации, а также контроля препаратов при длительном хранении. Причем это можно делать только по данным флуориметрии, когда необходимы не абсолютные значения КОЕ, а данные о степени повреждения препарата от действия экстремальных факторов. Следует учесть, что для получения количественных данных (КОЕ) калибровочные кривые следует делать отдельно для каждого вида, а возможно, и штамма.

Ряд данных об особенностях строения наружных слоев оболочечного комплекса грамотрицательных бактерий удалось выявить при изучении проникновения в клетку бромистого этидия в присутствии детергентов различных классов. В частности, катионный детергент цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ) разрушал мембранный аппарат клеток *E. coli*, *F. tularensis* и *Y. pestis*. У капсулообразующих штаммов *E. coli* этот процесс замедлялся и носил s-образный характер. Этот же феномен наблюдался у мутантов *E. coli* по длине цепочки липополисахарида: чем она длиннее, тем более замедлялся процесс лизиса, и s-образность процесса носила более выраженный характер. В то же время капсула *Y. pestis*, образованная F-антигеном, ускоряла процесс лизиса клеток в присутствии ЦТАБ. Неионный детергент тритон X-100 действовал на клетки *E. coli* только в присутствии ЭДТА, на *F. tularensis* – без ЭДТА, а клетки *Y. pestis* были нечувствительны к детергенту и в присутствии ЭДТА. Таким образом регистрация флуоресценции бромистого этидия в бактериальных суспензиях на фоне действия детергентов различных классов позволила исследовать особенности поверхностных структур оболочки грамотрицательных бактерий.

Кроме изучения взаимодействия бактериальных клеток с флуоресцентными зондами и метками (бромистый этидий, акридиновый оранжевый, флуоресцеин диацетат, ANS), мы исследовали и собственную флуоресценцию бактерий.

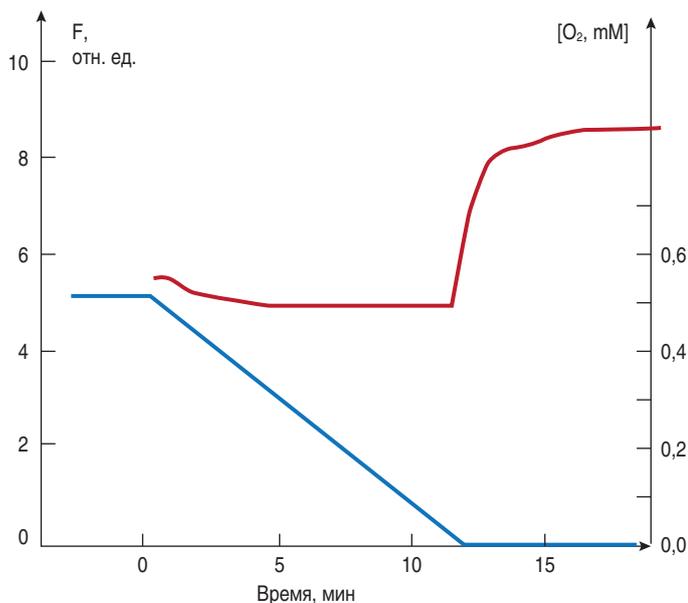
В параллельных опытах измерения концентрации кислорода в суспензиях покоящихся бактерий полярографическим методом и их флуоресценции было установлено, что в момент исчерпания кислорода в результате дыхательной активности клеток резко возрастала флуоресценция в области 420–460 нм. Спектр флуоресценции соответствовал таковому восстановленной формы никотинамид динуклеотида (NADH). Этот феномен повторялся на культурах *E. coli*,



Ю.М.Помыткин, кандидат медицинских наук, ученый секретарь (1982–2005 гг.) До переезда в Оболенск работал в Хабаровском медицинском институте (заведовал кафедрой, был деканом факультета, проректором по учебной работе. [Юбилейная книга: 75 лет Дальневосточному государственному медицинскому университету. Хабаровск: Издательство ГОУ ВПО Дальневосточный государственный медицинский университет, 2005, 326 с. ISBN 5-85797-110-1].

F. tularensis и *Y. pestis*. Отличия были лишь в динамике и соотношении интенсивностей флуоресценции в присутствии кислорода и после его исчерпания. Присутствие различных источников углерода также влияло на параметры изменения собственной флуоресценции бактериальных клеток. Эти эксперименты, выполненные мной и Т.Ю.Кудрявцевой под руководством Е.О.Пучкова, легли в основу методики измерения скорости дыхания бактерий по интенсивности их собственной флуоресценции.

Не могу не упомянуть метод рефрактометрической цитометрии, который внедрил и усовершенствовал в нашем центре к.м.н. В.Ф.Дашченко. Метод, разработанный Б.А.Фихманом, основывается на аноптральной микроскопии (разновидность фазово-контрастной микроскопии) и использовании специальной иммерсионной среды для приготовления микропрепаратов. Коэффициент преломления этой среды (желатин) подбирался близким к таковому микробной клетки. При этом в препарате на темном фоне виден лишь ярко светящийся контур клеточной стенки. Повреждение клетки или ее гибель сопровождается изменением коэффициента преломления, что сопровождается либо полным засвечиванием клетки в случае ее гибели, либо появлением ярко светящихся участков цитоплазмы у поврежденных клеток. Метод субъективен, поэтому В.Ф.Дашченко дополнил микроскоп фотометром, позволяющим измерять свечение клеток по сравнению с окружающей средой. В ходе опыта измерялась светимость нескольких сотен клеток в препарате вручную, что в конечном итоге давало возможность определить процент живых особей.



Динамика изменений флуоресценции (красная линия) и концентрации кислорода (синяя линия) в суспензии клеток *E. coli* в процессе дыхания. $\lambda_{\text{возб.}} = 340$ нм, $\lambda_{\text{рег.}} = 430$ нм. Концентрация клеток 1 мг с.в./мл.

Популяционный анализ бактериальных клеток актуален в биотехнологиях, основанных на культивировании микроорганизмов, поскольку позволяет выявлять тонкие изменения структуры клеток, что важно как при отработке регламента культивирования, так для мониторинга процесса. С использованием современных компьютерных технологий метод может быть модифицирован путем машинного анализа цифровых изображений и дальнейшей их обработки (форма клеток, коэффициенты преломления и т.д.).

Таким образом, в ГНЦ ПМБ был разработан и активно использовался в исследованиях целый арсенал инструментальных методов бесконтактного анализа структурно-функционального состояния бактерий, включая возбудителей особо опасных инфекций.

По итогам этих работ было защищено 4 кандидатских и одна докторская диссертация. Ниже представлен список основных опубликованных работ, выполненных сотрудниками института по данной тематике.

Литература

1. Пучков Е.О., Говорунов И.Г. Способ оценки жизнеспособности грамотрицательных бактерий Авторское свидетельство СССР № 903382 1982, №5 1981 г.
2. Пучков Е.О., Говорунов И.Г. Низкотемпературная консервация бактерий. Обзорная информационный материал. Консервация генетических ресурсов. Серия II. Общие вопросы микробиологической промышленности. М.: ОНТИТЭИ микробиопром; 1982, 20 с.
3. Говорунов И.Г., Косарев Н.В., Евтодиенко Ю.В., Пучков Е.О. Исследование проницаемости мембран оболочки *Escherichia coli* для бромистого этидия. Микробиология. 1982; 51(5): 731-734.
4. Пучков Е.О., Говорунов И.Г., Евтодиенко Ю.В., Косарев Н.В. Действие шока, вызванного низкой температурой, и внеклеточного образования льда на внешнюю и цитоплазматическую мембраны клеток *Escherichia coli*. Микробиология. 1983; 52(1): 136-139.

5. Пучков Е.О., Говорунов И.Г. Проблемы криоконсервации бактериальных культур. Информационный материал. Консервация генетических ресурсов. Пушкино, ОНТИ НЦБИ, 1983, 23 с.
6. Говорунов И.Г. Нефелометрический и флуориметрический анализ барьерных свойств мембран *E. coli* после низкотемпературных воздействий. Автореферат дисс. ... к.б.н. Оболенск. 1984.
7. Пучков Е.О., Говорунов И.Г., Косарев Н.В., Пинчукова В.А. Комплексный анализ повреждений мембран *E. coli* после низкотемпературного анабиоза. II Всесоюзная конференция по анабиозу. Рига, 1984, с. 90-91.
8. Говорунов И.Г. Пучков Е.О. Исследование нефелометрических параметров плазмолитической реакции бактерий *Escherichia coli* K-12. Прикладная биохимия и микробиология. 1987; 23(2): 260-265.
9. Пучков Е.О., Говорунов И.Г. Повреждение мембран бактерий при низкотемпературном анабиозе. Торможение жизнедеятельности клеток. Под ред. М.Е.Бекера. Рига, 1987, с. 144-155.
10. Пучков Е.О., Косарев Н.В. Флуориметрический контроль концентрации клеток в бактериальной популяции. Всес. конференция. «Биофизика Микробных Популяций». Красноярск, 1987, с. 143.
11. Пучков Е.О., Апонин Ю.М., Ирхин А.И., Ванякин Е.Н. Анализ кинетики действия цетилтриметиламмонийбромид на мембраны капсульного варианта *E. Coli* Ca189, регистрируемой по флуоресценции бромистого этидия. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1988; 1: 8-11.
12. Говорунов И.Г. Пучков Е.О. Экспрессный метод определения жизнеспособности клеток *E. coli* K-12, подвергнутых действию низких температур. Микробиология. 1988; 57(2): 347-351.
13. Пучков Е.О. Методы определения содержания и жизнеспособности микроорганизмов. Биотехнология. 1988; 4(1): 132-142.
14. Косарев Н.В., Пучков Е.О. Определение концентрации бактерий по флуоресценции бромистого этидия. Микробиология. 1989; 58(1): 149-153.
15. Ирхин А.И., Кондрашенко Т.Н., Пучков Е.О. Чувствительность мембран клеток *E. coli* к детергентам разных классов. Микробиология. 1989; 58(2): 217-221.
16. Иванов С.А., Говорунов И.Г., Сахаров Б.В., Пучков Е.О. Влияние осмотического давления культуральной среды на клетки вакцинного штамма 15 *F. tularensis*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1990; 11: 3-6.
17. Говорунов И.Г., Кудрявцева Т.Ю., Пучков Е.О. Динамика внутрибактериальных пиридиновых нуклеотидов при переходе аэробно-анаэробия. Тезисы докладов VI Всероссийского съезда микробиологов, эпидемиологов и паразитологов. Нижний Новгород, 1991. М., 1991, Т. 2, с. 218.
18. Пучков Е.О., Пинчукова В.А., Иванов С.А. Характеристика транспорта ионов калия через мембрану бактерий вакцинной культуры *Francisella tularensis*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1991; 6: 11-13.
19. Дашченко В.Ф., Говорунов И.Г. Метод рефрактометрической циторефрактометрии для анализа жизнеспособности и гетерогенности по степени повреждения микробных популяций *Yersinia pestis*. Тезисы докладов VI Всероссийского съезда микробиологов, эпидемиологов и паразитологов. Нижний Новгород, 1991. М., 1991, Т. 2, с. 62-63.
20. Говорунов И.Г., Дашченко В.Ф. Динамика морфологических изменений клеток в процессе реактивации живой сухой чумной вакцины Всерос. конф. «Иммунология и специфическая профилактика особо опасных инфекций». г. Саратов, 21-23 сентября, 1993 г. Саратов, с. 153
21. Говорунов И.Г., Дашченко В.Ф., Благодатских А.Я. Взаимодействие бактерий *Y. pestis* и *F. tularensis* с бромистым этидием. Всерос. конф. «Иммунология и специфическая профилактика особо опасных инфекций». г. Саратов, 21-23 сентября, 1993 г. Саратов, с. 154
22. Говорунова В.А., Говорунов И.Г., Фирстова В.В., Зырина Е.В. Исследование взаимодействия бромистого этидия с клетками бактерий рода *Yersinia* в лиофилизированных/регидратированных препаратах. Проблемы особо опасных инфекций. 2012; 1(111): 54-56.

Материалы V Национального конгресса бактериологов (дополнения)

Москва, 16–17 сентября 2019 г.

Выявление методом полимеразной цепной реакции вариантных штаммов *Burkholderia thailandensis*, содержащих кластер генов биосинтеза капсульного полисахарида, высокоомологичный *Burkholderia pseudomallei*

Васильева К.В., Тетерятникова Н.Н.,
Кузютина Ю.А., Захарова И.Б.

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

Burkholderia thailandensis входит в состав комплекса «*B. pseudomallei*», однако, в отличие от возбудителей мелиоидоза и сапа, *B. pseudomallei* и *B. mallei* являются слабовирулентными микроорганизмами.

Одним из основных факторов вирулентности *B. pseudomallei* является кластер генов биосинтеза капсульного полисахарида, который у большинства штаммов *B. thailandensis* заменен на кластер генов биосинтеза экзополисахаридов (EPS). Однако были обнаружены вариантные штаммы *B. thailandensis*, обозначенные BTCV, у которых вместо EPS присутствует область, обладающая высокой гомологией с кластером генов капсульного полисахарида *B. pseudomallei*, получившая название Vp-like CPS. Кроме того, обнаружено, что BTCV штаммы *B. thailandensis* могут являться причиной тяжелых инфекций, включая сепсис.

Целью настоящей работы было изучение распространенности BTCV штаммов среди почвенных изолятов *B. thailandensis*, выделенных во Вьетнаме в 2016–2019 гг.

Для проведения исследования нами был разработан набор из 6 пар праймеров, специфичных гомологам генов *wcbO*, *wcbJ*, *wcbI*, *wcbH*, *wcbF* и *wcbD* *B. pseudomallei*, входящих в состав Vp-like CPS кластера генов биосинтеза капсульного полисахарида *B. thailandensis*. Данные генетические мишени присутствуют у штаммов *B. pseudomallei*, BTCV *B. thailandensis* и отсутствуют у *B. thailandensis* E264.

С использованием этого набора праймеров был проведен ПЦР-скрининг геномной ДНК, выделенной из 74 штаммов идентифицированных ранее как вид *B. thailandensis*. В качестве положительных контролей были взяты ДНК *B. pseudomallei* ВКМ900 и *B. thailandensis* 2.1 (Genbank ас. PHRD00000000), для которого известно присутствие

Vp-like CPS кластера генов биосинтеза капсульного полисахарида, отрицательным контролем служила ДНК референтного штамма *B. thailandensis* E264 из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Показано, что у 8 штаммов *B. thailandensis*, включая *B. thailandensis* 2.1, присутствуют все ожидаемые ампликоны, у 45 штаммов обнаружены вариации в количестве и составе детектируемых генов, и у 21 штамма специфических ампликонов не выявлено. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о присутствии в геномах 11% штаммов полноценного Vp-like CPS кластера, у 61% – частично редуцированного и у 28% штаммов данный генетический кластер отсутствует.

Данный подход позволяет оценивать потенциал вирулентности штаммов *B. thailandensis* путем выявления BTCV штаммов *B. thailandensis* методом ПЦР.

Встречаемость резистентных штаммов *Escherichia coli* в микробиоте генитального тракта

Годовалов А.П.¹, Даниелян Т.Ю.², Карпунина Т.И.¹

¹ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А.Вагнера» Пермь, Российская Федерация;

²ООО «Медицинская студия», Пермь, Российская Федерация

Общепризнано, что *Escherichia coli* является одним из основных условно-патогенных микроорганизмов, обнаруживаемых в репродуктивном тракте женщин.

Цель исследования. Изучить антибиотикочувствительность *E. coli*, изолированных из вагинально-цервикального секрета.

Материалы и методы. Всего исследовано 319 штаммов *E. coli*, в том числе от пациенток с бесплодием – 131 и 188 – от фертильных женщин. Чувствительность к ампициллину, цефазолину, цефоперазону, цефотаксиму, цефепиму, азтреонаму, меропенему, гентамицину, амикацину, ципрофлоксацину и доксициклину определяли диско-диффузионным методом согласно МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». Результаты анализировали с помощью программы

WHONET 5.6 (США). При оценке данных использовали критерий χ^2 Пирсона.

Результаты. В совокупности полирезистентность (MDR) выявлена у 8,5% штаммов *E. coli*, экстенсивная резистентность (XDR) – у 8,2%, а панрезистентность (PDR) не зарегистрирована. Чаще всего штаммы *E. coli* проявляли устойчивость к пенициллинам (21,3%) и, отчасти, к монобактамам (9,1%). Число резистентных вариантов к прочим препаратам не превышало 3%. Не выявлено различий по встречаемости MDR- и XDR-штаммов *E. coli* среди пациенток с бесплодием и фертильных женщин. Такие штаммы встречались с равной частотой в сравниваемых группах, что оказалось неожиданным, поскольку анамнез женщин с бесплодием свидетельствует о неоднократном назначении комбинаций антибиотиков в связи с лечением инфекционно-воспалительных заболеваний. Не менее странным выглядит тот факт, что при бесплодии практически не встречались штаммы *E. coli*, устойчивые к пенициллинам (7,6 и 30,8%; $p < 0,05$). Более того, если исключить из анализа MDR- и XDR-штаммы *E. coli*, то в генитальном тракте пациенток с бесплодием резистентные штаммы можно отнести к редким находкам по сравнению с фертильными женщинами (2,3 и 9,0%; $p < 0,05$).

Заключение. Из цервикально-вагинального секрета штаммы *E. coli* с устойчивостью к нескольким антибиотикам изолировали относительно редко. Прослеженные тенденции не укладываются в традиционные представления о возникновении и селекции резистентных штаммов, в частности в репродуктивных органах, в том числе при бесплодии, что требует дальнейшего изучения.

Изучение некоторых особенностей штаммов *Escherichia coli*, выделенных при воспалительных заболеваниях урогенитального тракта

Годвалов А.П.^{1,2}, Ожгибесов Г.П.²,
Никулина Е.А.², Рожкова А.Л.²

¹ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А.Вагнера», Пермь, Российская Федерация;

²ФКУЗ «Медико-санитарная часть МВД России по Пермскому краю», Пермь, Российская Федерация

В последние годы регистрируется неуклонный рост заболеваемости, обусловленной условно-патогенной микрофлорой, среди которой ключевую роль играет кишечная палочка. Благодаря своим уникальным свойствам *E. coli* могут успешно колонизировать все ткани и органы человека. Достаточно детально описаны их факторы патогенности, однако некоторым свойствам *E. coli* уделяется относительно мало внимания.

Цель исследования. Оценить встречаемость *E. coli* при воспалительных заболеваниях урогенитального тракта, а также свойства выделенных штаммов.

Материалы и методы. За 2016–2018 гг. проведено микробиологическое исследование 514 проб мочи пациенток с хроническим пиелонефритом и 535 проб отделяемого цервикального канала женщин с хроническим цервицитом и

вагинитом. *E. coli* выделяли на агаре Эндо. Изучали тинкториальные и культуральные свойства, способность к движению, ферментацию лактозы, утилизацию цитрата, уреазную и гемолитическую активности. Для статистического анализа данных использовали критерий χ^2 .

Результаты. При хроническом пиелонефрите *E. coli* обнаружены в 21,6% случаев, причем в 76% из них – выделены типичные варианты. Среди нетипичных штаммов в 58,6% преобладали утратившие подвижность. Реже встречались гемолитические (20,7%) и лактозонегативные штаммы (17%). В трети случаев гемолитические штаммы не ферментировали лактозу. В отделяемом цервикального канала при хронических неспецифических цервицитах и вагинитах *E. coli* обнаружены в 12,3%, что существенно меньше, чем при исследовании проб мочи ($p < 0,05$). Однако в цервикальном канале нетипичные варианты *E. coli* детектировали значимо чаще (60,6%), чем в пробах мочи ($p < 0,05$). Среди нетипичных вариантов часто встречались гемолитические (60%) и лактозонегативные (50%).

Заключение. Показано, что нетипичные штаммы встречаются при воспалительных заболеваниях мочеполовой системы более чем в трети случаев выделения *E. coli*, что, скорее всего, обусловлено высокой пластичностью их генома, когда утрата некоторых свойств может быть необходима для успешной колонизации несвойственного биотопа. Потеря подвижности штаммами, вовлеченными в развитие воспалительного процесса, выглядит неожиданной, поскольку при утере или параличе жгутиков *E. coli* блокируется начальный этап биопленкообразования, необходимый для успешной колонизации поверхности. Однако можно предположить, что это компенсаторное снижение из-за увеличения транскрипционного уровня других белков, например, токсинов, оказывающих повреждающее действие на ткани человека.

Чувствительность к антибиотикам *Salmonella*, выделенных от людей и из пищевых продуктов

Егорова С.А., Забровская А.В.

ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Несмотря на то что в Российской Федерации сохраняется тенденция к снижению заболеваемости, сальмонеллезы занимают третье место в этиологической структуре групповой заболеваемости, где фактором передачи послужили продукты животного происхождения. При большом разнообразии сероваров, выделяемых от людей и из пищевых продуктов, в РФ отмечено превалирование серовара *S. enteritidis*, составившего 81,0% штаммов *Salmonella*, выделенных от людей, и 52,0% – из продуктов питания. Вследствие широкого применения антибиотиков для лечения и стимуляции роста у сельскохозяйственных животных пищевые продукты животного происхождения являются факторами передачи для человека резистентных к антибиотикам штаммов *Salmonella*. Ведущие системы надзора за сальмонеллезами

включают мониторинг чувствительности штаммов, выделенных от людей, животных и из пищевых продуктов, к антибиотикам, прежде всего «критически» важным для медицины: фторхинолонам и цефалоспорином.

Мониторинг чувствительности к антибиотикам штаммов *Salmonella*, выделенных от людей и из пищевых продуктов животного происхождения в 2014–2018 гг. в Санкт-Петербурге, выявил высокую устойчивость к фторхинолонам, которая обнаружена у 26,0% штаммов, выделенных из пищевых продуктов, и 59,0% от людей. Такая резистентность наиболее характерна для сероваров *S. enteritidis* (более 60,0% штаммов) и *S. infantis* (более 80,0% штаммов). Множественная устойчивость к антибиотикам чаще отмечена у штаммов, выделенных из пищевых продуктов, по сравнению со штаммами, выделенными от людей (41,6 и 15,8%). Наиболее высока доля таких штаммов в сероварах *S. typhimurium* (более 60%) и *S. infantis* (более 80%). Из отечественной и импортной свинины были выделены штаммы *S. typhimurium*, имеющие профиль множественной резистентности к антибиотикам, характерный для «монофазного» варианта *S. typhimurium*, возбудителя крупных вспышек сальмонеллез в странах Европы, США и Канаде. Устойчивость к цефалоспорином расширенного спектра обнаружена у 2,9% штаммов, выделенных от людей, в штаммах сальмонелл как часто (серовары *S. enteritidis*, *S. typhimurium*), так и редко (*S. Coeln*, *S. Dublin*, *S. Newport* и *S. Virchow*) встречающихся, причем большинство продуцируемых бета-лактамаз расширенного спектра относились к генетическому семейству CTX-M. Из пищевых продуктов выделены единичные штаммы *S. Dublin* (1,0%), продуцирующие бета-лактамазу CMY-2.

Продукция животноводства является фактором передачи человеку штаммов *Salmonella* разных сероваров как чувствительных, так и резистентных к клинически значимым антибиотикам. Меры по сдерживанию резистентности должны быть направлены в первую очередь на предупреждение ее формирования у штаммов, циркулирующих у сельскохозяйственных животных и птиц, и распространения таких штаммов при производстве пищевых продуктов.

Изучение адгезии *Listeria monocytogenes* к эритроцитам человека и барана при воздействии экстрактов органической массы шунгитовой породы

Серегина Н.В.¹, Гришаева Е.В.¹, Честнова Т.В.²

¹ГУЗ «Тульская областная станция переливания крови», Тула, Российская Федерация;

²ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», медицинский институт, Тула, Российская Федерация;

В настоящее время получены этанольный и ацетоновый экстракты органической массы шунгитовой породы, изучен их вещественный состав. Но нет достоверных данных о влиянии экстрактов на адгезию, которая является пусковым этапом инфекционного процесса, на факторы вирулентности условно-патогенных бактерий и на их биологические особенности. В настоящее время проявляется большой ин-

терес к изучению адгезии к клеткам-мишеням как важного фактора патогенности бактерий.

Цель исследования. Изучить адгезивные свойства клинических штаммов *Listeria monocytogenes* и музейного штамма *Listeria monocytogenes* I серогруппы ATCC 54180 к клеточным субстратам (эритроциты человека O(I) Rh(+) и эритроциты барана), а также оценить влияние экстрактов шунгита.

Материалы и методы. Изучение адгезивного процесса листерий проводилось согласно методическим рекомендациям В.И.Брилиса и Т.А.Брилене. Эритроциты выбраны в качестве универсальной модели для изучения адгезии, поскольку имеют на своей поверхности гликофорин – вещество, идентичное гликокаликсу эпителиальных клеток, на котором расположены рецепторы для адгезивных стафилококков. Методика предназначена для оценки адгезивных свойств с помощью следующих количественных показателей: СПА (средний показатель адгезии), КУЭ (коэффициент участия эритроцитов в адгезивном процессе), ИАМ (индекс адгезивности микроорганизма). Кровь брали от здорового барана в возрасте 3 лет в стерильный флакон с бусами и встряхивали в течение 10 минут для отделения фибрина, удаляли сыворотку. Эритроцитарную массу центрифугировали со скоростью 1000 об/мин, эритроциты отмывали физиологическим раствором для получения прозрачного надосадка. У человека брали кровь в день постановки реакции. С помощью денситометра фирмы Bio Merieux (Франция) готовили взвесь эритроцитов в физиологическом растворе 10⁸ клеток/мл 0,5 MF и взвесь бактерий 10⁹ клеток/мл 4 MF. Взвесь бактериальных культур, 1 мкл Д-маннозы, эритроциты барана или человека по капле наносили на обезжиренное предметное стекло, смешивали, инкубировали при температуре 37°C в течение 30 мин. На препараты наносили 1 и 3% растворы этанольного и ацетонового экстрактов органической массы шунгитовой породы. Готовые мазки высушивали при комнатной температуре, фиксировали в 96° этиловом спирте и окрашивали по Граму и Романовскому-Гимзе. Микроскопию проводили с помощью светового микроскопа СЕТ1. Для точной визуализации на экране компьютера применяли цифровую камеру-окуляр для микроскопа (модель ДСМ 3 МПикс) фирмы Shangrao Tele View Optical Instruments Co., Ltd. Было выполнено более 200 микрофотографий, изучено около 200 полей зрения.

Анализ данных показывает, что на модели эритроциты человека, контрольный музейный штамм *Listeria monocytogenes* (СПА<4) и листерии, выделенные из клинических образцов (СПА = 2,1–3,9), имели средние показатели адгезии. По сравнению с эритроцитами барана достоверных различий не было выявлено. Принимая во внимание другой показатель – индекс адгезивности, можно сделать вывод о том, что все листерии на эритроцитах человека и барана являлись высокоадгезивными (ИАМ>4,0). После экспозиции с растворами экстрактов шунгитовой породы адгезивные характеристики снижаются. Эксперимент демонстрирует незначительное уменьшение значений СПА, КУЭ, ИАМ у всех испытуемых клинических штаммов листерий при воздействии экстрактов по сравнению с контрольными образцами. Установление взаимоотношений между бактериями и эритроцитами при формировании межклеточных адгезивных

контактов на ранних этапах в эксперименте *in vitro* рассматривается нами как наиболее важное звено в ходе развития патогенетических событий. Выявление механизмов, обеспечивающих прикрепление *Listeria monocytogenes* к клеткам-мишеням, является эффективной предпосылкой для создания профилактических антиадгезивных препаратов на основе экстрактов шунгитовой породы.

Опыт определения маркеров сифилиса при тестировании крови доноров Тульской области

Серегина Н.В., Кунина Р.В.

ГУЗ «Тульская областная станция переливания крови», Тула, Российская Федерация

Обеспечение бактериальной безопасности донорской крови является значимой и актуальной проблемой, которая напрямую связана с качеством медицинского отбора доноров и лабораторного исследования полученной крови. Тестирование донорской крови на маркеры сифилиса лежит в основе ее инфекционной безопасности. Использование современных методов диагностики, высокочувствительных тест-систем позволяет свести к минимуму вероятность инфицирования сифилисом.

Цель исследования. Ретроспективный анализ выявления маркеров *Treponema pallidum* у доноров за период 2014–2018 гг.

Материалы и методы. В настоящее время, в соответствии с приказом МЗ РФ №87 от 2001 года «О совершенствовании, серологической диагностики сифилиса» виды серологических реакций, рекомендуемые для практического использования строго регламентированы. Эти методы выявляют большинство случаев инфицирования доноров сифилисом. Безусловной необходимостью является проведение скрининговых непрямых тестов и прямых трепонемных тестов. В лаборатории иммунологических исследований ГУЗ «ТОСПК» серологические маркеры в образцах крови выявлялись нетрепонемными тестами в качестве первичного скрининга. К реакциям этого типа относятся: реакции микропреципитации (РМП) и быстрый плазмореагиновый тест (RPR), который проводился с помощью набора реагентов «Антикардиолипин-РПР-Бест» (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). Трепонемные методы более чувствительны и специфичны. Использовался также иммуноферментный анализ (ИФА). Работу осуществляли на иммуноферментном автоматическом анализаторе Evolis (Bio-Rad, Франция) и ручным методом с помощью комплекта полуавтоматического ИФА-оборудования: спектрофотометров, автоматических промывателей, инкубаторов и отмывающих устройств (Bio-Rad).

Результаты. Согласно официальным данным, в Российской Федерации частота обнаружения серологических маркеров сифилиса у доноров в 2013–2017 гг. составила 0,79–0,49%. Сифилис по-прежнему представляет серьезную проблему. В ГУЗ «ТОСПК» в 2014 г. методами РМП и ИФА было обследовано 20 872 человека, положительных соответственно 33 (0,16%) и 132 (0,63%), что составляет 632,4 на

100 тысяч. В 2015 г. обследовано 23 300 человека, РМП-положительных 15 (0,06%), методом ИФА выявлено положительных результатов 101 (0,43%), что составляет 433,4 на 100 тысяч. В 2016 г. обследовано 24 492 человека, РМП-положительных 22 (0,09%), ИФА-положительных 120 (0,5%), что составляет 489,9 на 100 тысяч. За эти годы произошло увеличение количества доноров, в то же время выявляемость данных маркеров осталась приблизительно на одном уровне. В 2017 г. происходит снижение общего количества обследованных, что составляет 23 190 человек, из них 9 положительных результатов методом RPR (0,04%), ИФА-положительных – 57 (0,25%), что составляет 245,8 на 100 тысяч. В 2018 г. обследовано 23 348 доноров, положительных в RPR – 12 (0,05%), положительных в ИФА – 47 (0,2%) или 201,3 на 100 тысяч. С 2014 по 2018 гг. произошло уменьшение количества выделенных положительных маркеров. Общее количество доноров снизилось за отчетный период на 2476 человек. В пересчете на 100 тысяч, это составило 431,1 случай. Качественный серологический скрининг образцов является ключевым фактором, который обеспечивает безопасность донорской крови.

Мониторинг бактериологического контроля в медицинских организациях г. Череповца за 2016–2018 гг.

Скопенко О.Л., Неустроева Н.Ю., Ульянова О.В., Блохина О.П., Бронзова Н.Н.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Вологодской области», Череповец, Российская Федерация

Бактериологический мониторинг играет важную роль в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (ИСМП), и обеспечивает контроль за факторами, влияющими на их распространение.

Цель исследования. Провести мониторинг микробной обсемененности внешней среды медицинских организаций (МО) г. Череповца за период 2016–2018 гг.

Материалы и методы. За указанный период в структуре бактериологических исследований из МО наибольший процент приходится на исследование смывов: в 2016 г. – 52,1%; в 2017 г. – 52,3%; в 2018 г. – 54,9%. На втором месте исследование материала на стерильность: в 2016 г. – 30,4%; в 2017 г. – 30,8%; в 2018 г. – 28,1%; затем контроль работы стерилизующей аппаратуры: в 2016 г. – 9,3%; в 2017 г. – 10,4%; в 2018 г. – 10,1% и на последнем месте исследование воздуха: в 2016 г. – 8,2%; в 2017 г. – 6,5%; в 2018 г. – 6,9%.

Оценивая результаты бактериологического контроля смывов с объектов внешней среды, отметим, что имеет место увеличение неудовлетворительных проб по обнаружению БГКП (2018 г. – 0,27%; 2017 г. – 0,07%), *S. aureus* (2018 г. – 0,19%; 2017 г. – 0,14%). В 2018 г. наблюдалось уменьшение количества исследований материала на стерильность, неудовлетворительные пробы в 2018 г. составили 1,1%, тогда как в 2017 г. – 0,82%, 2016 г. – 0,55%.

С 2016 г. по 2018 г. в 1,3 раза увеличилось количество исследований эффективности работы стерилизующей аппа-

ратуры. Основной объем данных исследований поступает из частных стоматологических кабинетов.

При исследовании воздуха отмечается стабильное неблагополучие в хирургических стационарах: ежегодно имеются неудовлетворительные пробы ОМЧ (2016 г. – 18,2%; 2017 г. – 2,1%; 2018 г. – 9,1%) и *S. aureus* (в 2016 г. – 9,4%; 2017 г. – 6,4%; 2018 г. – 11,7%). Общий процент проб, не соответствующих санитарно-противоэпидемическим требованиям, составил в 2016 г. 0,5%; в 2017 г. – 0,61%; в 2018 г. – 0,56%. Одним из факторов, способствующих возникновению ИСМП, является микробная обсемененность внешней среды МО.

В 2018 г. в МО г. Череповца зарегистрировано 270 случаев ИСМП, что на 15% меньше, чем в 2017 г. (319 случаев). По нозологической структуре из числа зарегистрированных ИСМП гнойно-септические инфекции (ГСИ) новорожденных – 25,6% (2016 г. – 28,1%; 2017 г. – 26,1%; 2018 г. – 22,6%), послеоперационные осложнения – 23,9% (2016 г. – 25%; 2017 г. – 20,1%; 2018 г. – 27,4%), внутриутробные инфекции – 18,6% (2016 г. – 20,4%; 2017 г. – 16,9%; 2018 г. – 18,9%), пневмонии – 15,5% (2016 г. – 15,4%; 2017 г. – 17,6%; 2018 г. – 13,3%), острые кишечные инфекции – 8,5% (2016 г. – 4,6%; 2017 г. – 12,2%; 2018 г. – 7,8%), постинъекционные осложнения – 4,2% (2016 г. – 3,8%; 2017 г. – 3,4%; 2018 г. – 5,6%), ГСИ родильниц – 2,9% (2016 г. – 2,7%; 2017 г. – 2,8%; 2018 г. – 3,3%), прочие инфекции – 0,8%.

Вывод. Полученные результаты не полностью отображают реальную картину, так как крупные МО города выполняют производственный контроль на собственной базе. Однако ведущим фактором, способствующим возникновению ИСМП, является микробная обсемененность внешней среды. С помощью бактериологического мониторинга можно своевременно прогнозировать необходимые мероприятия для предотвращения осложнений эпидемической ситуации.

Чувствительность к антимикробным препаратам штаммов энтерококков, выделенных из крови

Смирнова М.В.¹, Артемук С.Д.¹,
Белькова Е.И.¹, Мельцер А.А.¹,
Тимирбаева О.Ю.², Козлова Н.С.²,
Метляева А.В.³

¹СПб ГБУЗ «Городская Мариинская больница»,
Санкт-Петербург, Российская Федерация;

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

³ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный
педиатрический медицинский университет»,
Санкт-Петербург, Российская Федерация

Цель исследования. Определить уровень устойчивости к антимикробным препаратам (АМП) штаммов энтерококков в многопрофильном стационаре Санкт-Петербурга.

Материалы и методы. Исследование охватывает 71 штамм энтерококков, в том числе 46 культур *Enterococcus faecalis* и 25 изолятов *Enterococcus faecium*, выделенных из крови пациентов многопрофильного стационара в 2018 г. Идентификацию бактерий проводили классическими

методами. Определение чувствительности выделенных штаммов к АМП проводили согласно клиническим рекомендациям по определению чувствительности к антимикробным препаратам, 2015.

Результаты. Все изученные культуры *E. faecium* были устойчивы к ампициллину, что связано с более высокой продукцией ими ПСБ5 по сравнению с другими энтерококками, а также к фторхинолонам (ципрофлоксацину и левофлоксацину) и аминогликозидам (гентамицину и стрептомицину), при этом штаммы с высоким уровнем устойчивости к последним составили почти треть (28,0%) от числа выделенных культур. Было выявлено по три штамма (по 12%) *E. faecium*, нечувствительных к ванкомицину и линезолиду, при этом культуры с одновременной резистентностью к этим двум препаратам отсутствовали. Большинство штаммов *E. faecalis* (95,6%) были устойчивы хотя бы к одному АМП, при этом чаще встречались культуры, резистентные к фторхинолонам (93,5% – к ципрофлоксацину и 89,1% – к левофлоксацину), реже – к аминогликозидам (63,0%), при этом более половины (51,7%) из них обладали высоким уровнем резистентности и к ампициллину (26,1%). Не было выявлено культур, устойчивых к ванкомицину и линезолиду. У 14 полирезистентных штаммов (восемь *E. faecalis* и шесть *E. faecium*) дополнительно была определена чувствительность к тигециклину, все культуры были к нему чувствительны. Полирезистентные (MDR) штаммы составили более половины выделенных энтерококков (52,1%), при этом к ним относились все изоляты *E. faecium*, а удельный вес MDR культур среди *E. faecalis* был почти в 4 раза ниже (26,1%). У *E. faecium* было выявлено 3, у *E. faecalis* 5 спектров антибиотикорезистентности. Среди *E. faecalis* наиболее распространенными оказались штаммы с одновременной устойчивостью к аминогликозидам и фторхинолонам (34,8%), среди *E. faecium* – к ампициллину, фторхинолонам и аминогликозидам (76,0%).

Выводы. Среди энтерококков в стационаре преобладали антибиотикорезистентные культуры с высоким удельным весом полирезистентных штаммов, которые были характерны прежде всего для *E. faecium*. Наибольшую активность в отношении энтерококков проявляли ванкомицин и линезолид.

Сравнительная оценка противомикробной активности соединений ряда ксантонов

Фролова В.В., Гурина С.В., Чернов Н.М., Яковлев И.П.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный
химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург,
Российская Федерация

Распространение антимикробной резистентности является одной из острых проблем современности. В связи с этим разработка новых противомикробных препаратов по-прежнему является одной из задач в борьбе с инфекционными болезнями.

Производные ксантона являются перспективными соединениями, так как обладают различными биологическими эффектами (антибактериальным, противогрибковым, проти-

вомалярийным, противоопухолевым, противовоспалительным, антиоксидантным, антигистаминным) [Kye-Simeon Masters et al., 2012]. Малоизученной группой среди ксантонов являются их частично гидрированные производные – дигидроксантоны. При этом фомалевон А, выделенный из культур Гавайского изолята *Phoma* sp., обладает противомикробной активностью в отношении грамположительных культур [Shim S.H. et al., 2011].

Поэтому целью исследования является поиск, синтез и изучение противомикробной активности производных ксантона.

На кафедре органической химии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета были синтезированы новые производные 4,4а-дигидроксантона с разными заместителями в ароматическом кольце [Chernov N.M. et al., 2017].

Антимикробную активность данных производных исследовали методом двукратных серийных разведений в жидких питательных средах с последующим высевом на плотные питательные среды.

Определяли минимальные ингибирующие цидные (МЦК) и статические концентрации (МСК) соединений. В качестве тест-культур использовали грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* ATCC 10702, *Mycobacterium* sp. K8, *Corynebacterium glutamicum* H-46, грамотрицательную бактерию *Escherichia coli* ATCC 25922 и дрожжи *Candida albicans* РКПГУ401.

Дигидроксантоны оказались малоактивны в отношении грамотрицательной культуры *Escherichia coli* и дрожжей *Candida albicans* (МЦК 125–250 мкг/мл). В отношении стафилококка, бациллы, микобактерии и коринебактерии соединения проявили умеренный и выраженный эффект. При этом была выявлена закономерность между строением дигидроксантонов и антимикробной активностью в отношении грамположительных культур.

Наличие электроноакцепторных заместителей приводило к повышению активности, а электронодонорные заместители снижали антимикробный эффект соединений.

МЦК незамещенного дигидроксантона составила 125 мкг/мл. Введение в седьмое положение хлора, брома, фтора или нитрогруппы незначительно увеличивало антимикробную активность соединений (МЦК 32–62,5 мкг/мл). Метильная группа в шестом и седьмом положениях снижала антимикробный эффект (МЦК 125–250 мкг/мл). Введение метоксигруппы в седьмое положение незначительно увеличивало активность (МЦК 32 мкг/мл). Введение в молекулу дигидроксантона второго галогена, а именно брома в 5 положение, увеличивало антимикробную активность соединений в 10 раз в отношении грамположительных бактерий.

Было выявлено наиболее активное соединение – 5-бром-7-хлор-4,4а-дигидроксантон. Вещество оказывало выраженное статическое (МСК – 2 мкг/мл) и цидное (МЦК – 4 мкг/мл) антистафилококковое действие, схожее с активностью препарата сравнения. В качестве препарата сравнения был выбран антибиотик ванкомицин, обладающий выраженной антистафилококковой активностью (МЦК – 2 мкг/мл). МЦК в отношении *Bacillus cereus* составила 4 мкг/мл. На низшие актинобактерии (*Mycobacterium* sp. и *Corynebacterium glutamicum*) соединение оказывало выраженное статическое (МСК – 1–2 мкг/мл) и цидное (МЦК – 2–4 мкг/мл) действие.

Суммируя вышесказанное, можно сделать вывод, что получен новый перспективный класс противомикробных агентов – 4,4а-дигидроксантонов. Дальнейшее изучение данных соединений и их модификация позволят повысить их эффективность.

Применение ИФА в лабораторной диагностике лихорадки Ку в материале из объектов внешней среды на территории Алтайского края за период с 2012 по 2018 гг.

Щукина М.А.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Алтайском крае», Барнаул, Российская Федерация

Лихорадка Ку – зоонозная природно-антропургическая риккетсиозная инфекционная болезнь с различными механизмами передачи возбудителя. Источник возбудителя лихорадки Ку в антропургических очагах – сельскохозяйственные животные (крупный и мелкий рогатый скот, лошади, птицы), в природных очагах – дикие млекопитающие (преимущественно грызуны) и птицы. Резервуаром и переносчиком возбудителя лихорадки Ку являются иксодовые, аргасовые и гамазовые клещи.

Ежегодно в лаборатории особо опасных инфекций Центра гигиены и эпидемиологии в Алтайском крае проводится мониторинг природных очагов лихорадки Ку методом иммуноферментного анализа на обнаружение антигенов кокциелл Бернета (Ку-антиген) с применением тест-системы «ИФА-Ку-антиген», производства ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера». В среднем исследуется ежегодно по 700 проб материала из объектов внешней среды (сено, солома, шерсть, органы грызунов, иксодовые клещи), отобранных в 29 административных районах Алтайского края

С 2012–2016 гг. случаи подтверждения наличия антигена в исследованных пробах были единичными. Так, в 2012–2014 гг. лабораторией было получено 2 серопозитивных результата от мыши лесной (2012 г.). С 2015 г. количество серопозитивных результатов стало расти. Так, в 2015 г. из 700 проб было получено 4 серопозитивных результата от 1 пробы сена и 3 проб мышей. В 2016 г. из 700 проб в 18 был обнаружен антиген кокциелл Бернета (1 проба сена, 1 проба клеща, 16 проб мышей). В 2017 г. отмечен резкий подъем активности природных и антропургических очагов в Алтайском крае: из 700 проб получено 138 серопозитивных проб (42 пробы сена, 40 проб клещей, 56 проб селезенок грызунов). В 2018 г. эпизоотическая напряженность оставалась на высоком уровне: из 700 проб получено 137 серопозитивных проб (19 проб сена, 118 проб органов мелких млекопитающих).

Таким образом, в период 2012–2018 гг. отмечено две фазы активности природных очагов кокциеллеза – фаза низкой активности очагов в 2012–2016 гг. и фаза высокой активности в 2017–2018 гг. Напряженность ситуации по кокциеллезу является неоднородной и подчиняется цикличности со сменой фаз.

Вклад Ю.И.Соркина в изучение и профилактику сибирской язвы в Сибири и на Дальнем Востоке

З.Ф.Дугаржапова¹, Е.В.Кравец¹, М.В.Чеснокова¹, Г.Ю.Соркина², С.А.Косилко¹, С.В.Балахонов¹

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора, Иркутск, Российская Федерация;

²ОГБОУ СПО «Иркутский базовый медицинский колледж», Иркутск, Российская Федерация

Contribution of Yu.I. Sorkin to the study and prevention of anthrax in Siberia and the Far East

Z.F.Dugarzhapova¹, E.V.Kravets¹, M.V.Chesnokova¹, G.Yu.Sorkin², S.A.Kosilko¹, S.V.Balakhonov¹

¹Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rosпотребнадзор, Irkutsk, Russian Federation;

²Irkutsk Basic Medical College, Irkutsk, Russian Federation

В конце XIX – начале XX вв. крупные эпизоотии сибирской язвы отмечались в Восточной Сибири практически ежегодно. Росло количество мест, где эта болезнь встречалась впервые, т.е. увеличивалось число стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов. Восточно-Сибирские губернии и области входили в число 20 наиболее неблагополучных по заболеваемости животных губерний Российской Империи. В 1894–1912 гг. при высоком уровне заболеваний сельскохозяйственных животных сибирской язвой люди болели в десятки раз реже, что было обусловлено вольным выпасом скота на пастбищах, меньшим контактом с больными и павшими животными. Вместе с этим не хватало специалистов ветеринарной службы, соответственно, отсутствовала регистрация мест падежа и захоронений животных. В первой половине XX в. более 92% населенных пунктов региона не имели скотомогильников и биотермических ям; из-за отсутствия убойных площадок проводился подворный убой скота; отсутствовал должный учет неблагополучных пунктов и скотомогильников, отмечался низкий охват животных профилактической специфической иммунизацией.

Проблема снижения заболевания сибирской язвой животных и людей и дальнейшей ликвидации болезни в Советском Союзе требовала изучения истории, географии, эпидемиологии и эпизоотологии этой особо опасной инфекции. Огромный вклад в изучение вопросов сибирской язвы в Восточной Сибири внес кандидат медицинских наук Ю.И.Соркин.

Юрий Израилевич Соркин родился 28 июля 1928 г. в г. Иркутске. После окончания санитарно-гигиенического факультета Иркутского медицинского института, с 1953 по 1958 гг. Ю.И.Соркин работал начальником Славянского

противочумного отделения Приморской противочумной станции, в 1959 г. поступил на должность младшего научного сотрудника в Иркутский государственный научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока.

Основным научным направлением его деятельности являлось изучение эпидемиологии, микробиологии и экологии возбудителя сибирской язвы. Работа с отчетными, обзорными, статистическими и архивными материалами Тувинской, Бурятской и Якутской АССР, Читинской, Иркутской областей, Красноярского края и Центрального государственного архива СССР за 108-летний период (1860–1967 гг.) позволила провести ретроспективный эпидемиологический анализ вспышек и спорадических случаев сибирской язвы за период 1943–1967 гг. Юрием Израилевичем составлен перечень из 1486 стационарно неблагополучных пунктов шести субъектов Восточной Сибири (Тувинская, Якутская, Бурятская автономные республики, Красноярский край, Иркутская и Читинская области), уточнены расположения сибиреязвенных очагов, стационарно неблагополучных пунктов, сибиреязвенных захоронений (скотомогильников), созданы





карты распространения сибирской язвы в Восточной Сибири. Эти сведения стали основой для создания Справочника неблагополучных по сибирской язве населенных пунктов РСФСР (1978 г.) и позже Кадастра стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов РФ (2005 г.).

В 1960–1970 гг. Соркин Ю.И. принимал участие в исследовательских работах по обустройству и проведению санитарных мероприятий при строительстве Иркутской, Красноярской и Усть-Илимской ГЭС, а также Селенгинского целлюлозно-картонного комбината. В 1966 г. он введен в состав Межведомственной комиссии по борьбе с сибирской язвой Министерства здравоохранения и Госагропрома СССР. Вместе со специалистами ветеринарной и санитарной служб изучил особенности эпизоотологии и эпидемиологии сибирской язвы в каждом Восточно-Сибирском субъекте, сроки и условия сохранения микробов сибирской язвы в некоторых типах почв Восточной Сибири. Юрий Израилевич провел анализ системы противосибиреязвенных мероприятий, разработал рациональную систему мероприятий по предупреждению заболеваний сибирской язвой в регионе. Ю.И.Соркин считал, что профилактика является основой снижения и ликвидации заболеваний животных и населения сибирской язвой. Им были предложены мероприятия по увеличению охвата профилактическими прививками сельскохозяйственных животных частного сектора в учтенных пунктах; запрет на забой животных без предубойного и послеубойного ветеринарного осмотра; усилены меры административного наказания за вынужденный убой скота; оптимизирован порядок перегона животных на международных скотопронных трассах; обоснованы показания для сокращения специфических прививок декретированному контингенту населения.

В 1972 г. Юрий Израилевич защитил диссертацию «Сибирская язва в Восточной Сибири (1860–1967 гг.)» на соискание степени кандидата медицинских наук. С 1972 по 1977 гг. он – старший научный сотрудник, в 1977–1979 гг. – заведующий эпидемиологическим отделом Иркутского противочумного института.

Ю.И. Соркин длительное время являлся начальником санитарной противоэпидемиологической бригады (СПЭБ) института, отвечал за работу СПЭБ в очагах холеры, сибирской язвы в Астраханской области, Краснодарском крае и

других регионах. Возглавлял группу сотрудников института при эпидрасследовании вспышки сибирской язвы в г. Свердловске в 1979 г. После чего, в том же году, на базе отдела эпидемиологии института под его началом была организована лаборатория экологии возбудителей зоонозных инфекций, которой он руководил до 1996 г. В 1981 г. он был назначен членом Межведомственного координационного совета по научным исследованиям Госагропрома СССР и Минздрава СССР. Под его руководством выполнялись диссертационные работы по экологии и микробиологии, эпидемиологии сибирской язвы. Юрий Израилевич участвовал во всесоюзных и республиканских научных конференциях, съездах по вопросам профилактики сибирской язвы. До последних дней жизни (1997 г.) он работал в институте и опубликовал 96 научных работ.

Ю.И.Соркин постоянно оказывал консультативную помощь учреждениям санэпидслужбы по особо опасным инфекциям. Он запомнился коллегам как грамотный, отзывчивый и энергичный специалист. Выполнял общественную работу, являлся секретарем парткома института. Награжден орденом «Знак почета», знаком «Отличнику здравоохранения».

В настоящее время лаборатория сибирской язвы отдела эпидемиологии ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора успешно продолжает свою работу и в составе Испытательного лабораторного центра (ИЛЦ) проводит экспериментальные работы с микроорганизмами II группы патогенности и диагностические исследования материала, подозрительного на зараженность возбудителем сибирской язвы. Квалифицированный персонал лаборатории и ее современное оборудование позволяют выполнять исследования материалов на высоком профессиональном уровне. Лаборатория имеет большой опыт работы в ряде субъектов Сибирского и Дальневосточного федеральных округов (республики Бурятия и Саха (Якутия), Алтайский, Красноярский и Приморский края, Амурская, Новосибирская и Сахалинская области) при чрезвычайных ситуациях в период наводнений, вспышек и sporadических случаев сибирской язвы, мероприятий по санитарной подготовке лож водохранилищ Богучанской и Нижне-Бурейской ГЭС, а также проводит комплексные эпизоотолого-эпидемиологические обследо-

вания и оценку биологической опасности сибиреязвенных захоронений и скотомогильников, земельных участков под освоение и строительство различных объектов промышленного и гражданского строительства. Специалисты лаборатории оказывают научно-практическую и консультативно-методическую помощь учреждениям Роспотребнадзора, здравоохранения и ветеринарии по вопросам экологии, эпидемиологии, лабораторной диагностики, проведению профилактических противоэпидемических и дезинфекционных мероприятий.

Информация об авторах:

Дугаржапова Зоригма Федоровна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории сибирской язвы отдела эпидемиологии ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора
Адрес: 664047, Иркутск, Триллссера, 78
Телефон: (3952) 22-0143
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ni

Кравец Елена Владимировна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории сибирской язвы отдела эпидемиологии ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора
Адрес: 664047, Иркутск, Триллссера, 78
Телефон: (3952) 22-0143

Чеснокова Маргарита Валентиновна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая отделом научного и учебно-методического обеспечения ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора
Адрес: 664047, Иркутск, Триллссера, 78
Телефон: (3952) 22-1312

Соркина Галина Юрьевна, преподаватель высшей квалификационной категории ОГБОУ СПО «Иркутский базовый медицинский колледж»
Адрес: 664043, Иркутск, ул. Сергеева, 3, корп. 11
Телефон: (3952) 48-7513

Косилко Сергей Александрович, кандидат медицинских наук, заведующий отделом эпидемиологии ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора
Адрес: 664047, Иркутск, Триллссера, 78
Телефон: (3952) 22-1312

Балахонов Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, директор ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора
Адрес: 664047, Иркутск, Триллссера, 78
Тел.: (3952) 22-0135

Information about authors:

Zorigma F. Dugarzhapova, MD, PhD, senior researcher of the laboratory of anthrax of the epidemiology department, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rosпотребнадзор
Address: 78, Trilissera str., Irkutsk, 664047, Russian Federation
Phone: (3952) 22-0143
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ni

Elena V. Kravets, PhD (Biology), researcher at the laboratory of anthrax in the epidemiology department, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rosпотребнадзор
Address: 78, Trilissera str., Irkutsk, 664047, Russian Federation
Phone: (3952) 22-0143

Margarita V. Chesnokova, MD, PhD, DSc, professor, head of the department of scientific and educational support, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rosпотребнадзор
Address: 78, Trilissera str., Irkutsk, 664047, Russian Federation
Phone: (3952) 22-1312

Galina Yu. Sorkina, teacher of the highest qualification category, Irkutsk Basic Medical College
Address: 3/11 Sergeeva str., Irkutsk, 664043, Russian Federation
Phone: (3952) 248-7513

Sergey A. Kosilko, MD, PhD, head of the department of epidemiology, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rosпотребнадзор
Address: 78, Trilissera str., Irkutsk, 664047, Russian Federation
Phone: (3952) 22-1312

Sergey V. Balahonov, MD, PhD, DSc, professor, director of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rosпотребнадзор
Address: 78, Trilissera str., Irkutsk, 664047, Russian Federation
Phone: (3952) 22-0135

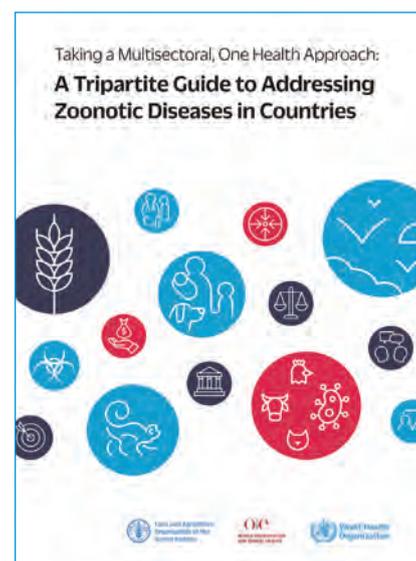
НОВОСТИ НАУКИ

ФАО, МЭБ и ВОЗ выпустили руководство для стран по применению подхода «Единое здоровье» для борьбы с зоонозными заболеваниями

Зоонозные заболевания – болезни, общие для животных и людей, – продолжают оказывать серьезное воздействие на здоровье человека. Ежегодно около 60 000 человек умирает от бешенства и других зоонозов, таких как птичий грипп, лихорадки Эбола или Рифт-Валли. Эти заболевания влияют также на здоровье и благополучие животных, вызывая снижение продуктивности (качество и безопасность молока или яиц и т. д.) или гибель, и, следовательно, влияют на средства к существованию фермеров и экономику стран.

Болезни не знают границ. Каждый день возникают новые проблемы со здоровьем на границе между человеком и животным. Чтобы противостоять этим угрозам, необходимы сотрудничество, координация, коммуникация и согласованные действия между различными секторами с использованием многосекторального подхода «единое здоровье». Тем не менее во многих странах отсутствуют возможности для реализации такого сотрудничества.

Чтобы поддержать страны в заполнении этих пробелов, Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН (ФАО), Всемирная организация здравоохранения животных (МЭБ) и Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) выпустили сегодня руководство под названием «Принятие многосекторального единого здравоохранения. Подход: трехстороннее руководство по борьбе с зоонозами в странах».



Taking a Multisectoral, One Health Approach: A Tripartite Guide to Addressing Zoonotic Diseases in Countries
©World Health Organization (WHO), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Organisation for Animal Health (OIE), 2019.
ISBN: 978-92-4-151493-4 (WHO); 978-92-5-131236-0 (FAO); 978-92-9-511504-0 (OIE)

Валентин Иванович Покровский

Как шутит Валентин Иванович Покровский: «Главная заслуга юбиляра в том, что он дожил до круглой даты», и все юбилейные статьи обычно начинаются одинаково: «выдающийся ученый», «организатор медицинской науки», «маститый деятель» и т. п. Не про них ли шутит сам Валентин Иванович: «На каждом новом юбилее как будто заранее на своих похоронах присутствуешь: знаешь, кто и что будет говорить, но редко говорят что-то новенькое, даже кое-что путают. Наверное, стареют!»

Часто авторы не забывают и о себе напомнить, добавляя: «Валентин Иванович – мой учитель». Но кого считать его учеником? Один из тех, кому он помогал, известен как талантливый организатор, другой – замечательный врач, третий – эпидемиолог-теоретик. Однако сам Валентин Иванович не подходит под узкоконкретные определения.

Поэтому мы пойдем другим путем. Зададим каверзный вопрос: «А что, собственно, заставляет нас вновь говорить и писать лестные слова о Валентине Ивановиче Покровском? Обычай? Долг? Традиция?»

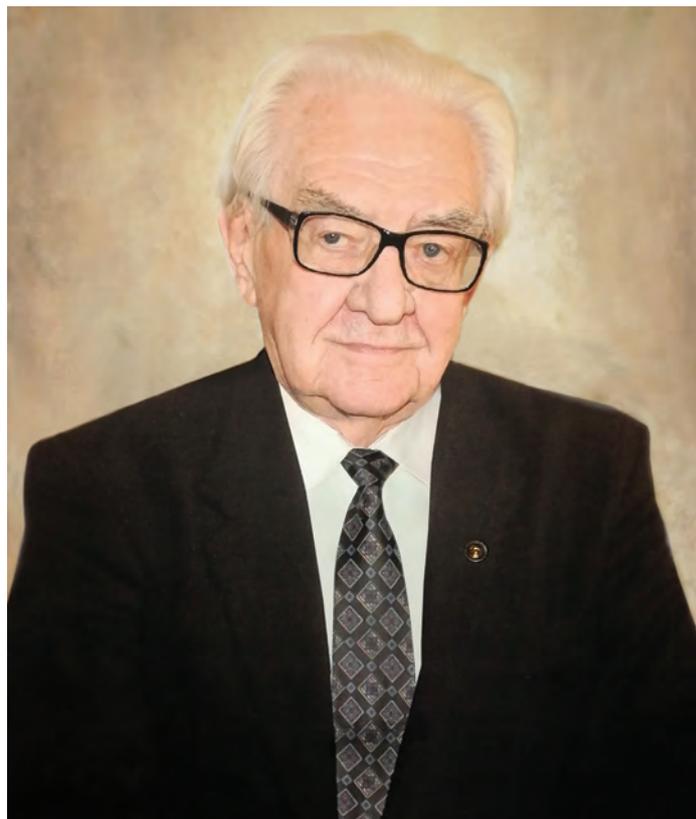
Что в его личности и судьбе заставляет нас вновь возвращаться к этой фигуре? Чем обусловлен его успех?

Крепкое здоровье и сильный ум? Это качества врожденные, унаследованные. Здоровых и умных не так уж мало. Да и что такое ум? Способность запоминать множество информации, пригодной для участия в телевизионных викторинах? Умение перемножать в уме пятизначные числа?

По многим критериям современный просвещенный обыватель может отнести Валентина Ивановича к полным бездарям: он не выучил до приличного уровня ни одного иностранного языка, не умеет водить машину и даже не научился печатать на пишущей машинке, не говоря уж о работе на компьютере. Не умеет играть на музыкальных инструментах, петь и танцевать. Никогда не занимался ни одним видом спорта. Как он без всего этого выжил? Видимо, должны были действовать какие-то особые факторы и возникать ситуации, повлиявшие на его развитие и формирование.

В годы его юности было плоховато с преподаванием английского, так как все учили язык самого опасного недруга, но в дальнейшем немецкий уже не было смысла совершенствовать. Пишущие машинки 50 лет назад были достижением техники, а в быту – роскошью. И спорт был важен чисто практический – пилка дров, посадка картошки, таскание ведер с водой. А потом был еще и бег «на дальние дистанции»: с работы – на работу. И кто из нынешних ученых может сам построить хотя бы сарайчик? А «спортом», которым Валентин Иванович до последнего времени занимался ради удовольствия, но который пока не входит в олимпийскую программу, являлись походы за грибами – пешие переходы до 30 километров в день.

С одной стороны, жизнь Валентина Ивановича Покровского – яркий пример работы «социальных лифтов» эпохи



социализма, когда выходец из простой семьи «запросто» мог стать руководителем государства, как, например, его почти ровесник, крестьянский сын М.С.Горбачев, с которым Валентину Ивановичу довелось встретиться в самый трагический момент истории. Впрочем, «лифты» в те годы, как и сейчас, быстро поднимали только артистов и спортсменов, а жизнь Валентина Ивановича была скорее примером долгого, тяжелого и часто опасного для здоровья восхождения. С другой стороны, не из всякого способного ребенка, ищущего «путь вверх», выходит академик. Но похоже, что Валентин Иванович, в отличие от многих «учеников», и не искал специально этого пути, им двигало что-то другое. Но что?

Валентин Иванович родился в 1929 г. в семье скромных служащих, в 12 лет потерял отца, погибшего в первые месяцы войны. Сам едва не сгорел, когда прямо в погреб, где он спал, попала немецкая бомба-зажигалка, но потом научился ловко гасить эти зажигалки песком и землей. Недоедание, холод, трудовая повинность на лесозаготовках, семейные заботы – все, что испытал русский народ в годы великой войны, выпало и на долю Валентина Ивановича. Ему приходилось ухаживать за домашними животными, торговать на рынке, ездить в южные города, чтобы менять на продукты какую-то «мануфактуру». Однако трудное детство и юность

в подмосковном поселке, населенном представителями самых разных социальных групп и национальностей, по всей видимости, способствовали развитию одного из его главных талантов – способности легко находить общий язык с людьми, будь то мужики, интеллигенты или чиновники.

Для его биографии важно, что в отличие от юношей-ровесников, которых трудные обстоятельства заставили бросить учебу, Валентин Иванович был нацелен староружимскими родственниками на высшее образование: в 1946 г. он окончил школу с медалью и поступил в медицинский институт, хотя, как он сам неоднократно признавался, и не чувствовал тогда призвания к медицине. Судя по некоторым его высказываниям о намерении стать дипломатом, он был романтиком, мечтал о путешествиях и приключениях, что, возможно, также оставило след в его характере.

В периоде учебы в медицинском институте я не вижу ничего необычного. Все мы там получали практически одни и те же знания, некоторые из которых, например, латинские названия всех костей черепа или плюсны, так большинству из нас негодились. Но состав профессоров и преподавателей в его время был выдающимся: немало было дореволюционных профессоров, получивших образование еще в царские времена, и одновременно представителей нового советского поколения, в том числе прошедших школу войны. Были и пострадавшие от сталинского режима. Возможно, что общение со всеми этими разными личностями способствовало развитию его гибкости в оценках людей и умению правильно оценивать сложившуюся общественную ситуацию. Во всяком случае, известна его доброжелательность ко всем людям, независимо от общественного положения.

Все студенты ходили в научные кружки, но не все стали заниматься наукой. И здесь я обратил бы внимание на не совсем обычное начало научного пути Валентина Ивановича. Первая его студенческая работа, кстати, опубликованная, была не совсем медицинской: она была посвящена истории кафедры инфекционных болезней Первого Московского медицинского института. Вполне возможно, что такое начало творческого пути заложило основы особого подхода Валентина Ивановича к научной деятельности, привнесло своего рода «исторический взгляд» на развитие науки, который в дальнейшем проявился в его способности предвидения развития ситуации, которую некоторые даже принимали за пророческий дар. Утверждают, что он потом предсказал подъем заболеваемости менингококковой инфекцией, эпидемию холеры, возрастающее значение легионеллеза и т.п. Лично я могу с полной ответственностью засвидетельствовать только то, что он первым обратил внимание на описание нескольких случаев неизвестного заболевания в США, получившего позднее название СПИДа, и затем организовал в Центральном НИИ эпидемиологии работу по его изучению задолго до того, как ВИЧ начал распространяться в России и пандемия ВИЧ/СПИДа приняла угрожающие масштабы. Впрочем, все пророки сильны задним числом.

Увлечение медициной четко проявилось у Валентина Ивановича только в ординатуре, когда он стал непосредственным участником лечебного процесса в клинике инфекционных болезней. Обходы, ночные дежурства, ежедневные разборы новых и интересных больных – у всех врачей есть что вспомнить об этом отрезке жизни, когда на практике

формируется будущий специалист. Но Валентин Иванович одновременно начал вести и научные исследования, а к концу ординатуры написал кандидатскую диссертацию. Вклад в науку его труда «Клиническое течение брюшного тифа и состояние некоторых защитных функций организма при лечении синтомицином» сейчас не представляется большим, но тема соответствовала периоду рассвета эры всестороннего изучения действия антибиотиков. Погружение в тему антибиотиков сыграло в дальнейшем большую роль в развитии Валентина Ивановича, и весь опыт работы над кандидатской диссертацией, конечно, был чрезвычайно важен для расширения его практических навыков и научного горизонта.

Для анализа процесса становления Валентина Ивановича как ученого большое значение имеет то, что, наряду с традиционным обзором с описанием клиники брюшного тифа (которое никому не мешало бы перечитать), в оригинальной части диссертации мы обнаруживаем микробиологические, иммунологические (серологические и фагоцитарные), неврологические и даже инструментальные методики, в частности плетизмографию. Например, описана в деталях выполнявшаяся самим автором стерильная пункция, проводившаяся для получения «костномозгового пунктата для бактериологического исследования». В тексте явно ощущается практический опыт и стремление автора поделиться им с читателем: «При прохождении иглы через костную пластинку ощущается характерный хруст и чувство провала, значительно более выраженное, чем при люмбальной и даже субокципитальной пункции». Сейчас все перечисленные процедуры относят к операциям и их разрешается выполнять только сертифицированным специалистам, но в те времена беспокоить кого-то по таким пустякам было просто неприлично, тем более для Валентина Ивановича. Здесь обнаруживается еще одна его особенность, а именно принцип: прежде чем учить других, научиться самому, то, что он и в последующие годы не приветствовал тенденцию здравоохранения на все более узкую специализацию медиков. Да, конечно, есть прославленные доктора, вся карьера которых сводится к виртуозному выполнению одной и той же операции у десятков тысяч пациентов, но Валентин Иванович, конечно, был не таков, он все время расширял сферу своей деятельности.

Разумеется, ординатора, написавшего диссертацию, нельзя было не зачислить в штат кафедры инфекционных болезней. А работа на кафедре требовала активного участия в педагогическом процессе. Хотя многие вспоминают, что ассистент Валентин Иванович Покровский «вел у них группу», ярких свидетельств того, что он уже тогда был особо талантливым педагогом, у нас нет. Но длительный опыт работы со студентами, несомненно, был впоследствии использован им в одной из его лучших (с литературно-педагогической точки зрения) работ: учебнике по инфекционным болезням для медицинских училищ. Едва ли в каком-нибудь другом учебнике описание инфекционных болезней дается в таком кратком и понятном виде. И недаром этой книгой всегда пользовались студенты и даже врачи, сдающие кандидатский минимум по инфекционным болезням.

Накопленный опыт пригодился Валентину Ивановичу в работе в отделении менингитов, результатом которой

стала докторская диссертация «Гнойные менингиты (клиника, диагностика и лечение)». И здесь мы видим способность Валентина Ивановича перешагнуть через сложившиеся стереотипы. Лечение менингитов внутримышечным введением больших доз пенициллина многим тогда казалось безумной авантюрой, и эта работа не только закрепила авторитет Валентина Ивановича как ученого, но и значительно расширила его кругозор. Сопровождающие работу исследования в области микробиологии подвели его к изучению L-форм возбудителя, а дальнейшее изучение менингококковой инфекции – к эпидемиологическим исследованиям.

Административный рост Валентина Ивановича не препятствовал его развитию как ученого, как это часто случалось, в том числе с его «учениками». Напротив, Валентин Иванович использовал его для дальнейшего научного развития. Назначение его директором Центрального НИИ эпидемиологии привело к тому, что, заряжаясь энергией и знаниями от коллектива института, он скоро превратился в ведущего специалиста и в этой области. Под его крылом развивалась не только прикладная эпидемиология, но своего расцвета достигла и теоретическая наука, что выразилось в развитии нескольких научных школ, которые вели в институте открытые дискуссии.

Научный опыт Валентина Ивановича, переросший в интуицию, в последние десятилетия ясно проявился и в том, что он на самом раннем этапе поддержал и потом всячески способствовал развитию в Центральном НИИ эпидемиологии молекулярной и генной диагностики инфекционных болезней – новейшего направления медицинской науки, грозящего в скором времени перерасти в генную терапию инфекций и генную вакцинацию.

Главный санитарный врач СССР П.Н.Бургасов, видимо из ревности, не желал признавать Валентина Ивановича эпидемиологом, лишь милостиво соглашался считать его «хорошим клиницистом». Ну, в крайнем случае, «лучшим эпидемиологом среди инфекционистов». Но время показало, что Валентин Иванович, который никогда не разделял эпидемиологию, микробиологию, вирусологию, иммунологию и инфекционные болезни, видел перспективу науки более широко. Проблемы, которые в настоящее время создает административное разделение эпидемиологической и инфекционной службы, а равно и разделение научных

учреждений нашего профиля по разным ведомствам, являются тому доказательством «от противного». Осложняет работу и стремление нашей научной элиты разделиться по своим мелким, но собственным, отдельным научным обществам, вернее сказать – «подобществам». Сможем ли мы когда-нибудь забыть амбиции и объединиться?

Более дискуссионным вопросом биографии Валентина Ивановича является его административная деятельность, в особенности его работа Президентом АМН СССР и Президентом РАМН, которые отняли почти 20 лет его жизни. Тысячи встреч, переговоров, трудных согласований. Финансы, кадры. Кадры, финансы. Письма «туда» и «оттуда», «отсюда» и «сюда». Стоило ли тратить столько энергии на сохранение самостоятельной Российской медицинской академии, которую после его ухода с поста Президента РАМН его последователи так легко отдали? Может быть, было бы лучше для науки и для него самого, если бы вместо бюрократических состязаний он продолжил заниматься непосредственно научными исследованиями? Но на эти вопросы пока едва ли может однозначно ответить сам Валентин Иванович или кто-нибудь другой. Похоже, однако, что российская медицинская наука без собственной академии упала в своем статусе. Кому же досталась чечевичная похлебка?

Впрочем, обо всем вышесказанном, о людях, встречах и разных приключениях, которые-таки случались в его жизни, мы скоро сможем прочитать в самых пикантных подробностях в мемуарах Валентина Ивановича, в которых мы познакомимся с его новой – литературной – ипостасью.

В итоге нашего краткого научного исследования феномена Валентина Ивановича Покровского мы приходим к выводу, что главными составляющим его успехов были стремление постоянно развивать и расширять свою профессиональную эрудицию и его непоколебимый оптимизм.

За это мы его и любим!

В.В.Покровский, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, руководитель специализированного научно-исследовательского отдела эпидемиологии и профилактики СПИД Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Роспотребнадзора

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 укоренения процедуры получения штаммов ГКПМ-Оболенск рассматривает факсимильные и электронные копии документов. Заявки необходимо отправлять на факс +7 (4967) 36-00-03 или электронный адрес info@obolensk.org. В заявке желательно указать контактные данные сотрудника, заинтересованного в получении штамма.*

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



Уважаемые коллеги!

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

приглашает Вас пройти обучение на курсах повышения квалификации

Обучение предусматривает:

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

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

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

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

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

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

Контактная информация:

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

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

E-mail: kuzin@obolensk.org

Подробная информация

www.obolensk.org Дополнительное профессиональное образование



Правила оформления статей (основные положения)

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

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

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

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

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

Требования к оформлению статьи.

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

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

Краткие сообщения представляются без таблиц и рисунков.

Статья должна быть подписана всеми авторами, включая иностранных.

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

Заглавие статьи оформляется следующим образом:

НАЗВАНИЕ СТАТЬИ

И. И. Иванов*, П. П. Петров**

*Первая организация, г. Москва, РФ

**Вторая организация, Техас, США

E-mail

[далее текст аннотации и ключевые слова]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Публикация – бесплатная.

Статьи направлять по адресу:

142279, Московская обл.,

Серпуховский р-н, п. Оболенск, ГНЦ ПМБ

Тел. (4967) 36-00-46

Факс (4967) 36-00-10

E-mail: info@obolensk.org

или

bacteriology@obolensk.org